

Lumineszenz-Untersuchungen zur Generierung und Relaxation von Singulett-Sauerstoff in zellulärer Umgebung



Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.) der Naturwissenschaftlichen Fakultät II - Physik der
Universität Regensburg

vorgelegt von
Jürgen Baier
aus Bamberg

November 2005

Promotionsgesuch eingereicht am: 17.10.2005

Die Arbeit wurde angeleitet von: Prof. Dr. Max Maier

Prüfungsausschuss:

Vorsitzender:	Prof. Dr. Matthias Brack
1. Gutachter:	Prof. Dr. Max Maier
2. Gutachter:	PD Dr. Wolfgang Bäuml
weiterer Prüfer:	Prof. Dr. Sergey Ganichev

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	9
2	Photodynamische Therapie (PDT)	13
3	Theoretische Grundlagen	17
3.1	Sauerstoff	17
3.2	Photosensibilisator	18
3.2.1	Typ-I-Reaktion	20
3.2.2	Typ-II-Reaktion	20
3.2.3	Übersicht der Reaktionen	21
3.3	Relaxation von Singulett-Sauerstoff	22
3.4	Chemischer und lumineszenztechnischer Nachweis von Singulett-Sauerstoff	23
3.4.1	Chemischer Nachweis	23
3.4.2	Nachweis über die Lumineszenz von Singulett-Sauerstoff	25
3.4.3	Natriumazid als Quencher	25
3.5	Modell für die Erzeugung und Relaxation von Singulett-Sauerstoff	26
3.6	Ermittlung der Raten und Ratenkonstanten	34
3.6.1	Ohne Energierücktransfer ($k_{\Delta T_1} = 0$)	34
3.6.2	Mit Energierücktransfer ($k_{\Delta T_1} > 0$)	36
3.6.3	Eindeutigkeit der Ratenbestimmung	40

3.7	Die Singulett-Sauerstoff-Quantenausbeute Φ_{Δ}	41
3.7.1	Direkte Bestimmung von Φ_{Δ}	41
3.7.2	Indirekte Bestimmung von Φ_{Δ}	43
4	Experimentelle Methoden	47
4.1	Versuchsaufbau	47
4.2	Fluoreszenz- und Durchlichtmikroskopie	50
4.3	Motivation dieser Arbeit	52
5	Singulett-Sauerstoff in Lösungen	55
5.1	Verwendete Photosensibilisatoren	55
5.1.1	Photofrin	56
5.1.2	9-acetoxy-2,7,12,17-tetrakis-(β -methoxyethyl)-Porphycen (ATMPn)	57
5.1.3	Tetraazaporphyrin	58
5.2	Singulett-Sauerstoff in reiner Lösung	60
5.3	Nachweismethoden für Singulett-Sauerstoff	62
5.3.1	Lumineszenzspektrum von Singulett-Sauerstoff	62
5.3.2	Lebensdauer von Singulett-Sauerstoff in Lösung	63
5.3.3	Natriumazid als Quencher	64
5.4	Tetraazaporphyrin in Lösung	65
5.4.1	Sauerstoffvariation	66
5.4.2	Farbstoffvariation	67
5.4.3	Natriumazidvariation	68
6	Singulett-Sauerstoff in wässriger Suspension	71
6.1	Material und Methoden	71
6.1.1	L- α -Phosphatidylcholin	72

6.1.2	Herstellung der Lipidsuspension	74
6.2	Lumineszenzmessung	75
6.2.1	Lipidsuspension	75
6.2.2	Lipidaufstrich	76
6.3	Durchlicht- und Fluoreszenzaufnahmen von Lipidsuspensionen . . .	78
6.4	Interpretation der Messergebnisse	79
6.5	Simulationen zur Diffusion von Singulett-Sauerstoff in Suspension .	81
7	Singulett-Sauerstoff in zellulärer Umgebung	87
7.1	Material und Methoden	88
7.1.1	Aufbau einer eukaryotischen Zelle	88
7.1.2	Erstellung der Zellsuspensionen	92
7.1.3	Probenerstellung zur subzellulären Lokalisation des Photosensibilisators	93
7.2	Bestimmung der Lokalisation der Photosensibilisatoren	94
7.3	Lumineszenzmessung	98
7.4	Zellvitalität	102
8	Singulett-Sauerstoff in bakterieller Umgebung	105
8.1	Material und Methoden	106
8.1.1	Aufbau eines Bakteriums	106
8.1.2	Erstellung der Bakteriensuspension	109
8.2	Durchlicht- und Fluoreszenzaufnahmen bei Bakteriensuspension . .	110
8.3	Lumineszenzmessung	112
8.3.1	Lumineszenz von <i>S. aureus</i> und <i>E. coli</i>	113
8.3.2	Variation der <i>S. aureus</i> -Konzentration	115
8.3.3	Variation der Natriumazid- und Photofrin-Konzentration . .	117
8.4	Zelltoxizität	119

9	Übersicht über die Ergebnisse und Erkenntnisse bei 532 nm Anregung	123
9.1	Singulett-Sauerstoff in Lösung	123
9.2	Singulett-Sauerstoff in Suspension	125
9.3	Singulett-Sauerstoff in zellulärer Umgebung	126
9.4	Singulett-Sauerstoff in bakterieller Umgebung	127
10	Messung bei der Anregungswellenlänge von 355 nm	129
10.1	Verwendete endogene Substanzen	130
10.1.1	Endogene Flavine	130
10.1.2	Weitere endogene Substanzen	132
10.1.3	Vergleichbare Photosensibilisatoren	135
10.1.4	L- α -Phosphatidylcholin	137
10.2	Generierung von Singulett-Sauerstoff durch endogene Photosensibilisatoren	138
10.2.1	Endogene Photosensibilisatoren in Lösung	138
10.2.2	Riboflavin in Lösung	141
10.2.2.1	Variation der Sauerstoff-Konzentration	142
10.2.2.2	Variation der Riboflavin-Konzentration	142
10.2.3	Singulett-Sauerstoff-Quantenausbeute Φ_{Δ} der Flavine	143
10.2.3.1	Direkte Bestimmung von Φ_{Δ} am Beispiel Riboflavin	144
10.2.3.2	Indirekte Bestimmung von Φ_{Δ}	145
10.2.4	L- α -Phosphatidylcholin in Lösung	147
10.2.5	Zellen in Lösung	150
11	Übersicht über die Ergebnisse und Erkenntnisse bei 355 nm Anregung	155
12	Zusammenfassung	159

A	Messprinzip zur Bestimmung des Sauerstoffgehalts	163
A.1	Faseroptische Messung der Sauerstoff- Konzentration	163
A.2	Löslichkeit von Sauerstoff in Flüssigkeiten	164
B	Probleme bei der Lumineszenzdetektion	167
C	Freeze-Pump-Thaw-Cycle	171
	Literaturverzeichnis	173

Kapitel 1

Einleitung

Die Photochemotherapie bezeichnet das Einbringen von lichtsensibilisierenden Substanzen in den Körper eines Menschen und die anschließende Bestrahlung mit Licht von geeigneter Wellenlänge zur Erzielung therapeutischer Effekte. Sie hielt ihren Einzug in den Reigen der medizinischen Therapien, weniger als Höhepunkt eines gezielten wissenschaftlichen Suchens nach einer neuen Behandlungsform bestimmter Krankheiten, sondern eher basierend auf zum Teil Jahrtausende alten Erfahrungen. Deshalb wurden erste Photochemotherapien bereits klinisch eingesetzt, als noch ein relativ grobes Wissen über deren Wirkprinzipien bestand. Dabei war man sich jedoch schon relativ früh bei einem Teil der Photochemotherapien, nämlich der photodynamischen Therapie, der Notwendigkeit der Anwesenheit von molekularem Sauerstoff bewusst. Weitere Forschung zeigte dann, dass der Sauerstoff, der durch den Energieübertrag vom Triplett- T_1 -Zustand eines Photosensibilisators (Farbstoff) in den elektronischen $^1\Delta_g$ -Zustand angeregt wurde, der sogenannte Singulett-Sauerstoff, bei der photodynamischen Therapie eine zentrale Rolle einnimmt.

Um die jeweilige Rolle des Singulett-Sauerstoffs innerhalb einer betrachteten Photochemotherapie näher zu bestimmen, bietet sich zunächst die Untersuchung der photophysikalischen Grundlagen der Erzeugung durch den jeweiligen Photosensibilisator sowie die Beobachtung der Relaxation des Singulett-Sauerstoffs an. Letztere ist entscheidend für dessen Wirkung, da bei größerer Lebensdauer eine stärkere Schädigung des Gewebes zu erwarten ist. Hierzu ist aufgrund der Variierbarkeit der Konzentrationen an Photosensibilisator und Sauerstoff das denkbar einfachste System, bestehend aus einer homogenen Lösung von Photosensibilisator und Sauerstoff in einem Lösungsmittel, zu wählen. Davon ausgehend ist es möglich, sich über Lipidsuspensionen schrittweise komplizierteren Systemen, wie etwa lebenden

Zellen, anzunähern.

Andererseits aber kann Singulett-Sauerstoff auch ohne den gezielten Einsatz von exogenen Photosensibilisatoren im menschlichen Gewebe erzeugt werden und zu Schädigungen führen. Dies kann durch endogene Stoffe unter Bestrahlung von UV-Licht der Sonne unerwünscht geschehen. Dabei können sowohl endogene Photosensibilisatoren über deren Triplett- T_1 -Zustand Singulett-Sauerstoff erzeugen, als auch chemische Reaktionen die durch UV-Licht ausgelöst werden. Auch hier ist es zweckmäßig, die endogenen Photosensibilisatoren im Lösungsmittel zu untersuchen, um die grundlegenden Mechanismen der Singulett-Sauerstoff-Erzeugung zu verstehen.

Bei der Untersuchung der photophysikalischen Grundlagen der Erzeugung und Relaxation von Singulett-Sauerstoff kommt dessen Detektion eine zentrale Rolle zu. Hierzu bieten sich zwei prinzipielle Verfahrensweisen an. Zum Einen der indirekte Nachweis durch Zugabe von Substanzen, welche durch den hochreaktiven Singulett-Sauerstoff auf möglichst definierte Weise chemisch verändert werden und anschließender Detektion dieser Reaktionsprodukte, zum Anderen der direkte Nachweis durch die Detektion der Lumineszenz des Singulett-Sauerstoffs bei 1269 nm. Dieser direkte Nachweis ist besonders erstrebenswert, da der indirekte, chemische Nachweis oftmals keine eindeutigen Ergebnisse liefert. Die direkte Detektion des Singulett-Sauerstoffs stellt jedoch, aufgrund der Wellenlänge im nahen Infrarot bei 1269 nm und vor allem wegen der sehr geringen Lumineszenzquantenausbeute, messtechnisch eine Herausforderung dar, wobei der im Rahmen der vorliegenden Arbeit eingesetzte Photomultiplier eine herausragende Verbesserung verspricht. Durch die hohe Sensitivität und das gute Signal-Rausch-Verhältnis des verwendeten Photomultipliers wird, in Verbindung mit einer schnellen Zähleinrichtung zum Einzelphotonenzählen, die zeitaufgelöste Lumineszenzspektroskopie an Singulett-Sauerstoff entscheidend erleichtert.

Aufgrund der verbesserten experimentellen Bedingungen ist es im Rahmen der vorliegenden Arbeit erstmals möglich, den spektroskopischen Nachweis von Singulett-Sauerstoff *in vitro*, das heißt hier in Suspensionen mit lebenden Zellen, zu erbringen. Dabei wurde der Singulett-Sauerstoff durch exogene Photosensibilisatoren, welche in die Zellen eingebracht wurden, erzeugt. Sowohl bei prokaryotischen (bakteriellen) als auch bei eukaryotischen (menschlichen) Zellen wurde dies durchgeführt. Durch Voruntersuchungen von Singulett-Sauerstoff in Lösung und in Lipidsuspensionen können durch den zeitlichen Verlauf der Singulett-Sauerstoff-Lumineszenz Erkenntnisse bezüglich des Verhaltens von Singulett-Sauerstoff in Zellen gewonnen werden. Da die Abklingzeit der Singulett-Sauerstoff-Lumineszenz spezifisch für die

jeweilige Umgebung des Singulett-Sauerstoffs ist, lässt sich der Aufenthaltsort von Singulett-Sauerstoff in Zellen eingrenzen. Die Erkenntnisse über die Lebensdauer und den Aufenthaltsort von Singulett-Sauerstoff in lebenden Zellen ist wichtig um den Prozess der Zerstörung von Zellen durch Singulett-Sauerstoff besser zu verstehen.

Um zweifelsfrei den Beweis zu führen, dass UV-Licht (insbesondere UVA-Licht) durch Singulett-Sauerstoff Schäden im menschlichen Gewebe verursacht, ist es notwendig, dass nicht nur der Nachweis erbracht wird, dass endogene Photosensibilisatoren Singulett-Sauerstoff erzeugen sondern dies auch mit einer gewissen Effizienz tun. Für Flavine, die als endogene Photosensibilisatoren mit Triplett-T₁-Zustand wirken, kann diese Effizienz (Singulett-Sauerstoff-Quantenausbeute) in Lösung, abhängig von der Sauerstoff-Konzentration, bestimmt werden. Auch das chemische Erzeugen von Singulett-Sauerstoff durch körpereigene Lipide bei UVA-Bestrahlung soll untersucht werden. Ausgehend von diesen Untersuchungen in Lösung konnte erstmals auch der Nachweis der Singulett-Sauerstoff-Erzeugung in Suspensionen mit lebenden Zellen durch UVA-Licht beobachtet werden.

Kapitel 2

Photodynamische Therapie (PDT)

Photosensibilisierung im Allgemeinen bezeichnet einen Prozess, durch welchen ein System mittels einer exogenen Substanz sensibel gegenüber Licht wird [L86]. Daraus folgt, dass ein Photosensibilisator als eine Substanz definiert werden kann, deren Einbringung in ein bestrahltes System bestimmte Effekte induziert, welche ohne diese Substanz nicht aufgetreten wären. Die Benutzung eines exogenen Photosensibilisators zur Erzielung eines therapeutischen Effektes über die Absorption von Licht wird als Photochemotherapie bezeichnet [DH91].

Die photodynamische Therapie behandelt im Speziellen die Anwendung der sauerstoff-abhängigen Photosensibilisierung [TJ07]. Behandelt werden dadurch hauptsächlich maligne Tumore und prä maligne Gewebeveränderungen, und zwar z.B. durch die Verwendung von Photofrin bei der systemischen photodynamischen oder durch 5-Aminolävulinsäure bei der topischen Therapie. Das Prinzip der photodynamischen Therapie ist in Abbildung 2.1 dargestellt. Nach der Verteilung des Photosensibilisators, entweder im gesamten Organismus oder aber im Areal der lokalen Verabreichung, folgt eine mehr oder weniger selektive Anreicherung im erkrankten Gewebe. Das Verhältnis von Photosensibilisator im Tumor- zu Normalgewebe beträgt etwa 3:1. Die für das Gefälle an Photosensibilisator-Konzentration zwischen erkranktem und gesundem Gewebe verantwortlichen Mechanismen sind nicht vollständig verstanden, jedoch dürften bestimmte Eigenschaften von tumorösem Gewebe, wie etwa ein erniedrigter pH-Wert oder aber durchlässigere Blutgefäße [DGH98] wie auch die Hydrophobizität des Photosensibilisators [ZPC01], eine Rolle spielen.

Durch Bestrahlung des zu behandelnden Areals mit Laserlicht bzw. inkohärentem Licht aus Lampen oder LED's werden Sauerstoffradikale (Typ-I-Reaktion) sowie Singulett-Sauerstoff (Typ-II-Reaktion) erzeugt, wobei dem Singulett-Sauerstoff eine

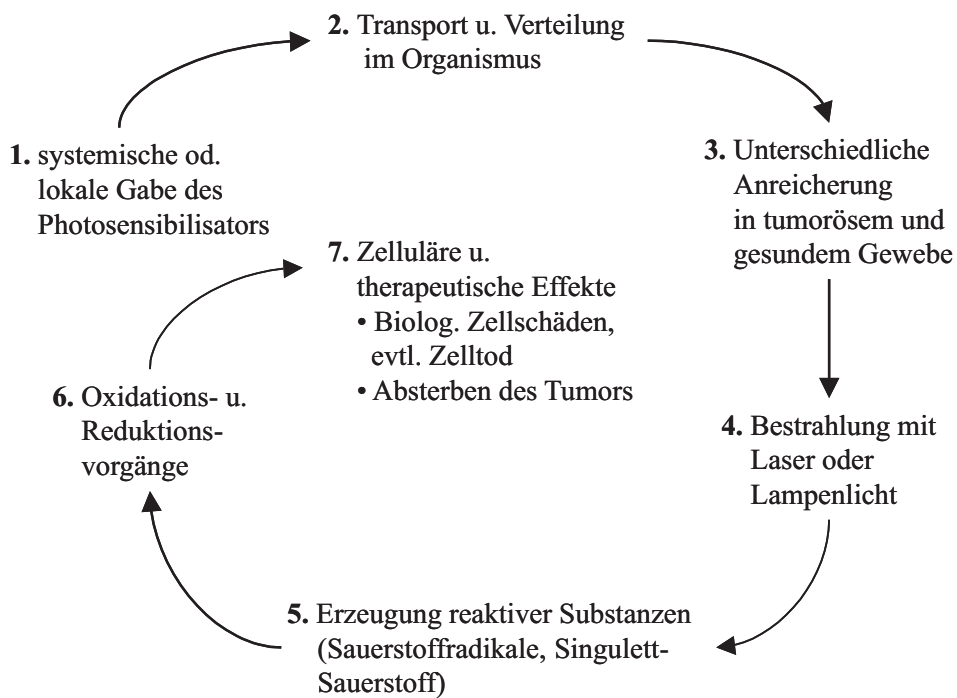


Abbildung 2.1: Schematischer Ablauf der photodynamischen Therapie [SL94].

dominierende Rolle in der photodynamischen Therapie (PDT) zugesprochen wird [JG94]. Jedoch häufen sich auch in zunehmendem Maß die Anzeichen dafür, dass auch Sauerstoffradikale eine nicht unwesentliche Rolle in der PDT zu spielen scheinen [A01]. Die Erzeugung des Singulett-Sauerstoffs wie auch der Sauerstoffradikale führt zu zahllosen Oxidations- und Reduktionsvorgängen innerhalb des Tumors, und zwar sowohl innerhalb der Tumorzellen selbst, als auch außerhalb der Tumorzellen wie etwa in Blutgefäßen oder bei den interzellulären Bestandteilen [P01]. Wird eine Tumorzelle durch Sauerstoffradikale und Singulett-Sauerstoff geschädigt, so können diese als primäre Effekte neben den direkt zum Zelltod führenden Mechanismen der Nekrose sowie der Apoptose (selbstverschuldeter Zelltod) noch weitere Folgen nach sich ziehen, wie etwa die Schädigung der Zellmembranen durch Lipidperoxidation und die Freisetzung von Entzündungsfaktoren durch die Aktivierung von sogenannten Transkriptionsfaktoren (u.a. Proteine).

Der in der PDT verwendete Photosensibilisator muss bestimmte Voraussetzungen erfüllen. Die Kriterien für einen in der medizinischen Therapie anwendbaren Photosensibilisator wurden erstmals im Jahre 1973 durch Dougherty formuliert [D73]:

- i. Keine Toxizität ohne Licht bei therapeutischen Dosierungen
- ii. Selektive Aufnahme und Akkumulation in erkranktem Gewebe
- iii. Aktivierung durch Licht oberhalb von 600 nm
- iv. Photochemische Aktivität

Während die ersten beiden Kriterien wie auch das letzte selbstverständlich erscheinen, muss das dritte näher betrachtet werden. Generell gilt, dass für die Eindringtiefe von Licht in Gewebe die verwendete Wellenlänge entscheidend ist [IMM95], da neben der Reflexion und der Rückwärtsstreuung die Absorption von Wasser, Hämoglobin und Melanin entscheidend sind. Somit ergibt sich ein sogenanntes optisches Fenster, innerhalb dessen die Eindringtiefe des Lichts in Gewebe mit steigender Wellenlänge größer wird, durch das jedoch die Photochemotherapie grundsätzlich auf erkranktes Gewebe nahe der Oberfläche des betroffenen Organs beschränkt bleibt. Ein idealer Photosensibilisator besitzt möglichst intensive Absorptionsbanden innerhalb des optischen Fensters. Abbildung 2.2 zeigt das durch die Absorption von Melanin, Hämoglobin und Wasser gebildete optische Fenster (gelb hinterlegt). Zur Absorptionskurve von Wasser ist zu bemerken, dass verschiedene in der Litera-

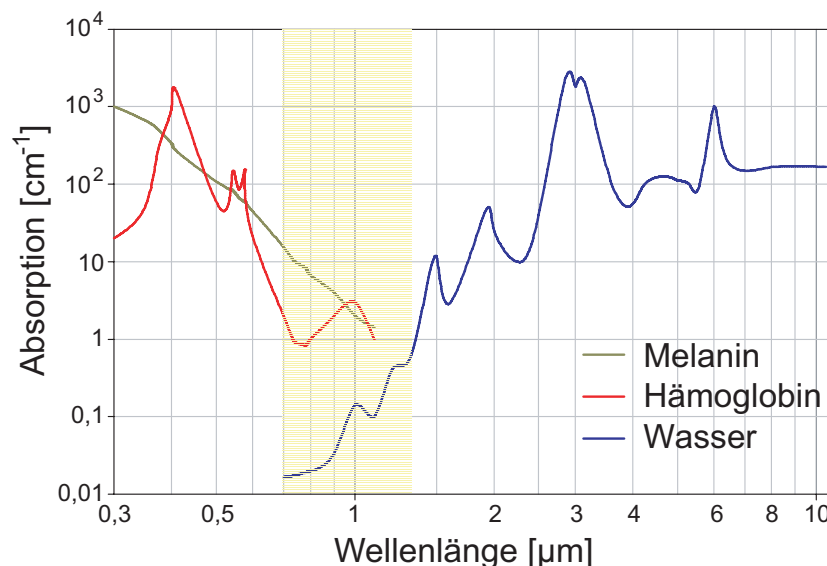


Abbildung 2.2: *Optisches Fenster bei der photodynamischen Therapie.*

tur zu findende Messungen um knapp eine Größenordnung bezüglich der Absorption differieren.

Neben den oben genannten Anforderungen existieren eine Reihe weitere an ein

ideales Photochemotherapeutikum, wie z.B. ein möglichst hoher Wirkungsgrad bezüglich Zelltötung. Desweiteren muss neben der Selektivität für erkranktes Gewebe eine gute Gewebepenetration gefordert werden, um eine ausreichend hohe Photosensibilisator-Konzentration im gesamten zu behandelnden Areal zu gewährleisten, wobei die selektive Anreicherung in besonders sensiblen Zellbereichen sehr wünschenswert wäre. Eine gute biologische Abbaubarkeit bzw. Ausscheidbarkeit des Photosensibilisators sowie von dessen Photoprodukten wäre wünschenswert und ist beispielsweise gerade bei Photofrin nicht gegeben, woraus die langanhaltende Photosensibilisierung folgt [DGH98].

Kapitel 3

Theoretische Grundlagen

In diesem Kapitel sollen die theoretischen Grundlagen zum besseren Verständnis der experimentellen Ergebnisse dargestellt werden.

3.1 Sauerstoff

Elementarer Sauerstoff kommt in der Natur in zwei Formen vor. Als Sauerstoff (Disauerstoff O_2) und als Ozon (Trisauerstoff O_3). In trockener, reiner Luft beträgt der Anteil von Sauerstoff 20,95 Volumenprozent bzw. 23,16 Gewichtsprozent. Natürlich vorkommender Sauerstoff besteht zu 99,762 % aus dem Isotop ^{16}O , zu 0,038 % aus ^{17}O und zu 0,200 % aus ^{18}O . [HWW85].

Die O_2 -Moleküle haben neben dem Grundzustand zwei niedrig angeregte elektronische Zustände mit der Multiplizität 1 (Singulett-Zustände). Dies sind der Zustand $^1\Delta_g$ (Singulett-Sauerstoff 1O_2) von dem in der weiteren Arbeit die Rede ist, sowie der energiereichere $^1\Sigma_g^+$, welcher allerdings sehr kurzlebig ist ($<10^{-9}s$) und hauptsächlich auf den $^1\Delta_g$ -Zustand relaxiert. Bei den Singulett-Zuständen haben die beiden antiparallelen π^* -Elektronen entgegengesetzten Spin und befinden sich beim $^1\Delta_g$ -Zustand im selben Molekülorbital, während sie beim $^1\Sigma_g^+$ -Zustand unterschiedliche Orbitale besetzen. Die angeregten Zustände und ihre energetische Lage sind in Abbildung 3.1 dargestellt. Der Übergang vom Triplett-Grundzustand $^3\Sigma_g^-$ in die angeregten Singulett-Zustände $^1\Delta_g$ und $^1\Sigma_g^+$, und umgekehrt, ist als elektrischer Dipolübergang aufgrund der Auswahlregeln für Spin, Drehimpuls und Parität verboten. Ein magnetischer Dipolübergang ist aufgrund der Drehimpulserhaltung ebenfalls nicht erlaubt. So erklärt sich auch die sehr lange strahlende Lebensdauer des $^1\Delta_g$ -Zustandes des

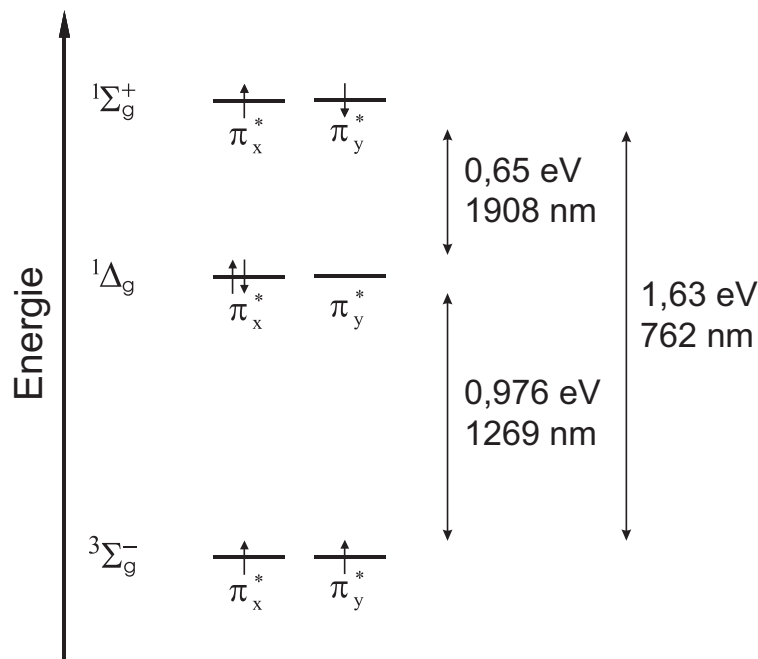


Abbildung 3.1: Konfiguration der beiden antibindenden π^* -Elektronen im Grundzustand und in den ersten beiden angeregten elektronischen Zuständen mit Energiedifferenzen.

freien Moleküls von 72 Minuten [SS03]. In Lösungen wird das strenge Verbot des Dipolübergangs durch Stöße zwar aufgeweicht, trotzdem ist dieser strahlende Zerfall auch dann noch sehr unwahrscheinlich, wodurch die Notwendigkeit für eine sehr empfindliche Nachweismethode für diese Lumineszenzstrahlung bei $\lambda = 1269 \text{ nm}$ besteht.

3.2 Photosensibilisator

Neben der direkten Erzeugung von Singulett-Sauerstoff durch die Absorption von Licht geeigneter Wellenlänge [ET76] sowie indirekter Methoden wie z.B. durch Beschuss einer Sauerstoff enthaltende Lösung mit hochenergetischer Elektronenstrahlung, durch Mikrowellenentladungen in Sauerstoffgas [WHR95], besteht die für die Photosensibilisierung wohl wichtigste Erzeugungsmodalität aus dem Transfer von Energie von einem Photosensibilisator im angeregten Zustand auf Sauerstoff im Grundzustand.

Der erste Schritt bei allen photosensibilisierenden Reaktionen besteht in der Absorption von Licht durch einen Photosensibilisator. Dadurch gelangt dieser in einen angeregten Zustand, bei dem es sich in der Regel um den S_1 -Zustand handelt und der

aufgrund des Franck-Condon-Prinzips zusätzlich schwingungsangeregt ist. Dieser angeregte Singulett-Zustand ist jedoch durch die sehr effektiven Relaxationsmechanismen der internen Konversion (Internal Conversion, IC) sowie der Abgabe von Fluoreszenzlicht sehr kurzlebig. Typische Lebensdauern liegen im Piko- und Nanosekundenbereich [BLT94] und deshalb ist die Wahrscheinlichkeit, in diesem Zustand mit anderen Molekülen zu interagieren, sehr gering [A01]. Durch einen Wechsel in der Spin-Multiplizität, der sog. Interkombination (Intersystem Crossing, ISC), welche vor allem durch die Spin-Bahn-Kopplung ermöglicht wird [HW98], ist zusätzlich die Relaxation in einen Triplett-Zustand möglich. Dabei handelt es sich im Allgemeinen um den T_1 -Zustand, der zunächst, ebenso wie der angeregte S_1 -Zustand, wegen des Franck-Condon-Prinzips eine Schwingungsanregung besitzt, die aber wiederum durch den strahlungslosen Prozess der internen Konversion sehr schnell abgegeben werden kann (die Lebensdauern von angeregten Schwingungsniveaus liegen etwa bei 10^{-11} bis 10^{-14} s [BLT94]). Der T_1 -Zustand besitzt nun die beiden Relaxationsmöglichkeiten der Interkombination sowie der Abgabe von Phosphoreszenzlicht.

Eine graphische Zusammenstellung all dieser Prozesse, das Jablonski-Diagramm, zeigt Abbildung 3.2. Dargestellt sind der Singulett-Grundzustand S_0 , der erste ange-

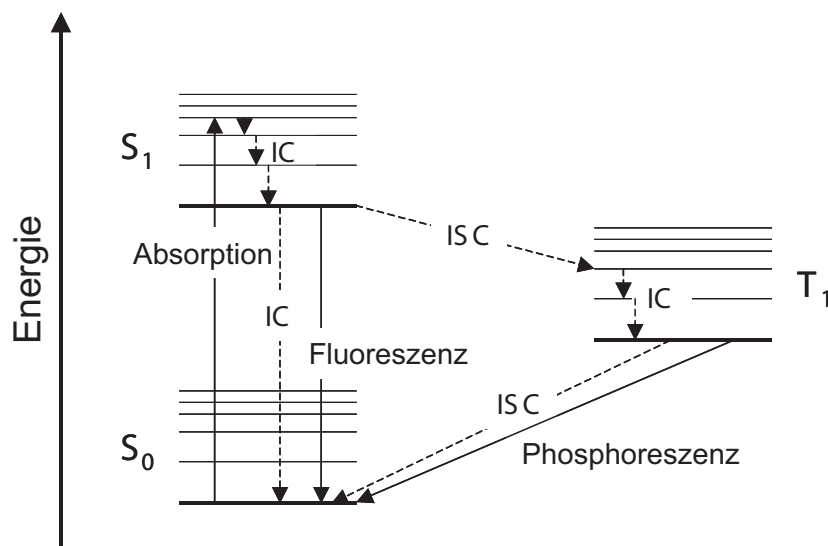


Abbildung 3.2: Jablonski-Diagramm für die Anregung und die möglichen Relaxationswege eines Photosensibilisators [A01].

regte Singulett-Zustand S_1 sowie der erste angeregte Triplett-Zustand T_1 . Jeder dieser elektronischen Zustände besitzt zusätzliche Schwingungsniveaus, welche durch dünne Linien angedeutet sind. Die strahlenden Übergänge Absorption, Fluoreszenz

und Phosphoreszenz werden durch durchgehende Pfeile repräsentiert, alle nicht-strahlenden Übergänge wie die Interne Konversion (IC) und die Interkombination (ISC) durch gestrichelte Pfeile. Da jedoch die Rate für die Interkombination $S_1 \rightarrow T_1$ im Allgemeinen etwa 10^4 bis 10^8 mal höher ist als die Rate für die Interkombination $T_1 \rightarrow S_0$ [SG68] und darüberhinaus eine Rückinterkombination $T_1 \rightarrow S_1$ wegen der Energiedifferenz zwischen T_1 und S_1 unwahrscheinlich ist, haben T_1 -Zustände eine wesentlich längere Lebensdauer als S_1 -Zustände. Je größer aber die Lebensdauer des T_1 -Zustandes des Photosensibilisators ist, desto größer ist die Wahrscheinlichkeit, durch Energieabgabe photochemische Reaktionen ablaufen zu lassen.

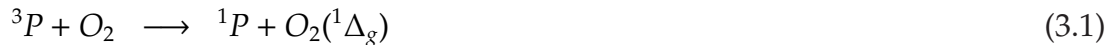
3.2.1 Typ-I-Reaktion

Diese photochemischen Reaktionen lassen sich in zwei Gruppen einteilen [F91]. Bei der sog. photodynamischen Reaktion vom Typ-I handelt es sich nach [A01] um eine Reaktion zwischen einem angeregten Photosensibilisator, gewöhnlich im T_1 -Zustand (3P), und einem Substratmolekül S , bei welcher ein Elektron oder ein Wasserstoffatom übertragen wird. Die Radikale, welche aus den primären Typ-I-Prozessen entstehen, können anschließend verschiedene Reaktionen eingehen. Bei Anwesenheit von Sauerstoff ist, neben der Generierung von Peroxidradikalen (SOO^\cdot) und Hydroperoxiden ($SOOH$), über eine Autooxidationskette die Generierung des Superoxidanions ($O_2^{\cdot-}$) wohl die wichtigste (der Punkt steht für ein ungepaartes Elektron). Das Superoxidanion ist in der Lage mit verschiedenen Substraten zu reagieren und dabei auch noch andere reaktive Sauerstoffspezies, wie Wasserstoffperoxid (H_2O_2) oder das Hydroxylradikal ($\cdot OH$), zu erzeugen.

3.2.2 Typ-II-Reaktion

Im Gegensatz zu den Reaktionen, welche bei der photodynamischen Reaktion vom Typ-I ablaufen und zur Bildung einiger Radikale führen können, ist die photodynamische Reaktion vom Typ-II relativ einfach. Bei ihr ist die Anwesenheit von Sauerstoff zwingend erforderlich und es findet lediglich ein direkter Energieübertrag vom angeregten Photosensibilisatormolekül P auf Sauerstoff statt. Dies führt zum Einen zur Relaxation des Sensibilisators aus dem T_1 -Zustand in den S_0 -Zustand, zum Anderen aber auch zur elektronischen Anregung von Sauerstoff in den in der

Regel niedrigsten Singulett-($^1\Delta_g$)-Zustand [F91, A01]:



Dieser angeregte Sauerstoff wird als Singulett-Sauerstoff $O_2(^1\Delta_g)$ oder kurz 1O_2 bezeichnet.

Die Anregung des Sauerstoffs zu Singulett-Sauerstoff kann über einen Ladungsaustausch zwischen angeregtem Farbstoff-Molekül und Sauerstoffmolekül im Grundzustand, oder über einen direkten Energieübertrag ohne Ladungsaustausch erfolgen [S05b].

3.2.3 Übersicht der Reaktionen

An dieser Stelle sei noch bemerkt, dass nach Anregung eines Photosensibilisators grundsätzlich beide Reaktionstypen ablaufen können. Die relativen Beiträge beider Reaktionstypen und damit die relativen Beiträge der einzelnen reaktiven Zwischenprodukte werden durch die äußeren Bedingungen [A01] (z.B. Sauerstoffgehalt) sowie durch spezifische Eigenschaften des Photosensibilisators, wie der energetischen Lage des T_1 -Niveaus [E03] oder des Oxidationspotentials des Photosensibilisators, bestimmt [WA97, SS01]. Einen Überblick über die wichtigsten primären Prozesse bei der Photosensibilisierung gibt Abbildung 3.3.

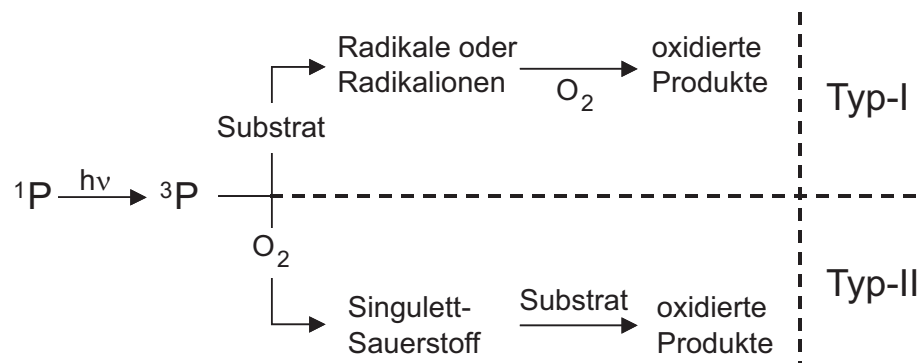


Abbildung 3.3: Übersicht über die wichtigsten Reaktionspfade bei der Photosensibilisierung [A01, F91].

Neben der photosensibilisierten Erzeugung von Singulett-Sauerstoff über Typ-II gibt es noch verschiedene chemische Möglichkeiten Singulett-Sauerstoff durch Typ-I-Radikale zu erzeugen [K77]. Sowohl das Superoxidanion (O_2^-) als auch der Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und das Hydroxylradikal ($\cdot OH$) können dies mit geeigneten Reaktionspartnern (z.B. Endoperoxide) bewirken.

3.3 Relaxation von Singulett-Sauerstoff

Eine schematische Skizze des Energieübertrags vom Sauerstoff- auf ein Lösungsmittelmolekül zeigt Abbildung 3.4. Hierbei relaxiert das Sauerstoffmolekül vom

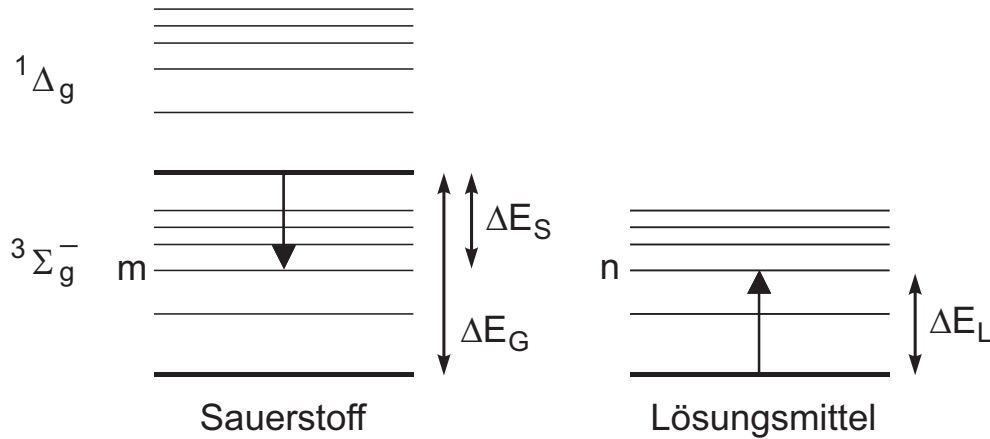


Abbildung 3.4: Schematische Darstellung des Energieübertrags von einem Sauerstoff- auf ein Lösungsmittelmolekül.

nullten Schwingungsniveau des $^1\Delta_g$ -Zustandes zum m -ten Schwingungsniveau des elektronischen Grundzustandes $^3\Sigma_g^-$ durch Energieübertrag auf ein Lösungsmittelmolekül, welches vom nullten Schwingungsniveau zum n -ten Schwingungsniveau des elektronischen Grundzustandes angeregt wird. Dabei gilt, dass die Anregungsenergie ΔE_G vom Sauerstoff um ΔE_S reduziert wird und das Lösungsmittel um die Energie ΔE_L angeregt wird.

$$\Delta E_G - \Delta E_S = \Delta E_L + \delta \quad (3.2)$$

Der dabei resultierende Energieunterschied δ und die Schwingungsanregungen werden in Wärme umgewandelt. Ein solcher Prozess ist um so wahrscheinlicher, je kleiner δ ist. Dabei relaxieren beim Sauerstoff Schwingungsniveaus mit $m > 1$ relativ schnell auf das erste angeregte Schwingungsniveau. Dieses hat, verglichen mit den anderen Niveaus eine relativ lange Lebensdauer bevor die Schwingungsenergie in Wärme umgewandelt wird. Weitere genauere Untersuchungen zur Relaxation von Singulett-Sauerstoff finden sich in der Diplomarbeit von Wiesmann [W04] und bei Schweitzer *et al.* [SS03].

Betrachtet man die strahlende Relaxation des Singulett-Sauerstoffs, so gilt hier die Auswahlregel $\Delta S = 0$. Insbesondere da dies für alle homonuklearen zweiatomigen Moleküle gilt [H50]. Desweiteren gilt für deren strahlende Relaxation noch die Auswahlregel für den Drehimpuls $\Delta \Lambda = 0, \pm 1$ und der vorgeschriebene Paritätswechsel

bei elektrischen Dipolübergängen. Somit stellt eine dennoch stattfindende Relaxation des Singulett-Sauerstoffs in seinen Grundzustand einen magnetischen Dipolübergang dar. Aufgrund der bei einem Übergang $^1\text{O}_2 \rightarrow ^3\text{O}_2$ stattfindenden Verletzung der oben genannten Auswahlregeln stellt der Singulett-Zustand einen bedeutenden metastabilen Zustand des O_2 -Moleküls dar. Insbesondere besitzt das isolierte Singulett-Sauerstoff-Molekül mit $\tau(^1\text{O}_2 \rightarrow ^3\text{O}_2) = 72$ Minuten [K85] eine extrem lange Lebensdauer bezüglich strahlender Relaxation. In Gasen, Lösungen und kondensierter Materie werden die Auswahlregeln aufgeweicht und es finden stoßinduzierte elektrische Dipolübergänge statt.

Jedoch ist die Lumineszenzquantenausbeute sehr klein, sie beträgt etwa $2 \cdot 10^{-5}$ in schwerem Wasser (D_2O) und circa $1 \cdot 10^{-6}$ in Wasser (H_2O) [LBG88]. Dies bedeutet zum Einen sehr schwache Lumineszenzsignale, zum Anderen, dass die strahlende Deaktivierung einen vernachlässigbaren Beitrag zur Relaxation einer gegebenen Konzentration $[^1\text{O}_2](t)$ an Singulett-Sauerstoffmolekülen liefert, so dass die Lumineszenzleistung $P_L^{1269}(t)$ bei 1269 nm für alle Zeiten proportional zur momentanen Konzentration angenommen werden kann:

$$P_L^{1269}(t) \propto [^1\text{O}_2](t) \quad (3.3)$$

3.4 Chemischer und lumineszenztechnischer Nachweis von Singulett-Sauerstoff

Der hoch reaktive Singulett-Sauerstoff kann sowohl über chemische Reaktionen und seinen Reaktionspartner nachgewiesen werden als auch über seine Lumineszenz, wenn Singulett-Sauerstoff unter Aussendung eines Photons in den Grundzustand übergeht. In diesem Abschnitt sollen die Möglichkeiten zum Nachweis von Singulett-Sauerstoff aufgezeigt werden. Es werden dabei prinzipielle Vor- und Nachteile dargestellt.

Zusätzlich soll noch auf die Rolle eines Quenchers als Nachweis für Singulett-Sauerstoff eingegangen werden.

3.4.1 Chemischer Nachweis

Bei den chemischen Nachweismethoden nutzt man die Fähigkeit des hoch reaktiven Singulett-Sauerstoffs aus, Moleküle zu verändern. Typischerweise entstehen

dabei Lipidhydroperoxide (LOOH). Diese entstehen beispielsweise als Endprodukt der Lipidperoxidation sowohl aus einfach als auch aus mehrfach ungesättigten Lipiden [G89]. In Abbildung 3.5 ist eine typische Lipidperoxidation skizziert. Dabei

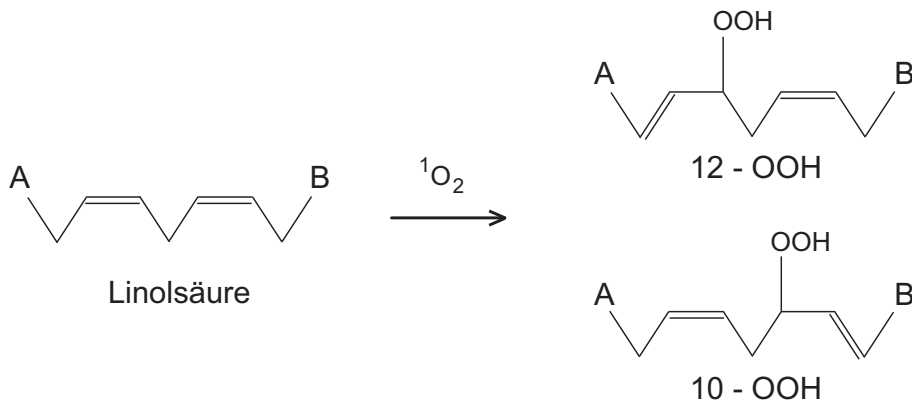


Abbildung 3.5: Schematische Darstellung der Lipidperoxidation.

wird die veresterte Linolsäure (Doppelbindungen zwischen 9. und 10. bzw. 12. und 13. Kohlenstoffatom) des Lipides (vgl. Abschnitt 6.1.1) umgewandelt. Es wird eine der beiden Doppelbindungen aufgebrochen und das Sauerstoff-Molekül, unter Entstehung einer Hydroperoxid-Seitengruppe (OOH), am Kohlenstoffatom 10 oder 12 angelagert. Weist man nun diese Lipidhydroperoxide nach, kann man Rückschlüsse auf das Vorhandensein von Singulett-Sauerstoff ziehen.

Ein typische Nachweismethode ist der Einsatz der Thiobarbitursäure (TBA) [G85]. Die saure Lösung (pH 3 - 4) mit den Lipidhydroperoxiden und der Thiobarbitursäure wird bei 100 °C erwärmt, wobei hauptsächlich Substanzen wie Malondialdehyd (MDA), Hexanal oder 4-Hydroxynonenal entstehen. Malondialdehyd bildet dabei mit der Thiobarbitursäure einen Komplex, der photometrisch gemessen werden kann. Die photometrische Messung erfolgt bei zwei Wellenlängen (520 nm und 535 nm). Die Differenz der photometrischen Ergebnisse dient zur Auswertung mittels Eichkurve, woraus dann der MDA-Gehalt abgeleitet werden kann. Vom MDA-Gehalt aus ist es möglich, auf den Lipidhydroperoxid-Anteil bzw. den Singulett-Sauerstoff-Anteil zurückzuschließen. Alternativ kann der Nachweis der Lipidhydroperoxide aber auch über die Massenspektroskopie (HPLC) geschehen [MMM04].

All diese Nachweismethoden haben jedoch einen entscheidenden Nachteil. Singulett-Sauerstoff wird nicht direkt nachgewiesen sondern über seine Folgeprodukte. Dies hat zur Folge, dass das Ergebnis mehrdeutig sein kann. Es ist nicht auszuschließen, dass auch andere Substanzen in diesem komplexen System Lipidhydroperoxid erzeugen oder vernichten [G85]. Auch die Proportionalität zwischen der Anzahl

der Lipidhydroperoxide und vorhandenen Singulett-Sauerstoff-Molekülen ist nicht immer gleich. Im Idealfall muss immer genug reaktionsfähiges Lipid vor Ort sein, um Lipidperoxidationen durchzuführen. Sind alle Lipide aufgebraucht, erfolgt kein weiterer Nachweis für Singulett-Sauerstoff mehr.

Diese Überlegungen zeigen, dass der chemische Nachweis von Singulett-Sauerstoff fehlerbehaftet ist und mit Vorsicht betrachtet werden muss. Fehlinterpretationen sind durchaus denkbar.

3.4.2 Nachweis über die Lumineszenz von Singulett-Sauerstoff

Eine bessere Möglichkeit Singulett-Sauerstoff zu detektieren, ist der direkte Nachweis über die Lumineszenz des Singulett-Sauerstoffs. Dabei sendet der Singulett-Sauerstoff beim Zerfall in den Grundzustand ein Photon mit der Wellenlänge $\lambda = 1269 \text{ nm}$ aus, welches detektiert werden kann. Diese Lumineszenz-Detektion wird in dieser Arbeit verwendet und in Abschnitt 4.1 beschrieben.

Der wesentliche Vorteil besteht darin, dass Singulett-Sauerstoff direkt nachgewiesen wird. Auch ist die Proportionalität zwischen der Anzahl der Singulett-Sauerstoff-Moleküle im untersuchten System und den tatsächlich detektierten gewährleistet (vgl. Abschnitt 3.3).

Nachteilig wirkt sich die geringe Lumineszenzquantenausbeute aus. Dadurch ist das Signal sehr schwach und hochempfindliche IR-Detektoren sind notwendig. Die kurze Lebensdauer von Singulett-Sauerstoff in Lösung von wenigen μs erschwert zusätzlich die Detektion. Eine Fehlerquelle kann sein, dass die Phosphoreszenz von beteiligten Substanzen, z.B. der Photosensibilisatoren die Singulett-Sauerstoff erzeugen, das Lumineszenzsignal von Singulett-Sauerstoff überlagern (siehe auch Anhang B) und somit zu Fehlinterpretationen führen.

Ist man sich der Probleme, die bei der Detektion der Lumineszenz von Singulett-Sauerstoff auftreten können, bewusst, kann dieser direkte Nachweis von Singulett-Sauerstoff neue und detailliertere Erkenntnisse liefern als der indirekte Nachweis über chemische Reaktionsprodukte.

3.4.3 Natriumazid als Quencher

Ein Quencher ist eine Substanz, welche angeregte Zustände eines anderen Stoffes deaktivieren kann. So kann durch die Anwesenheit eines Quenchers für Singulett-Sauerstoff der Nachweis erbracht werden, dass das entsprechende Lumineszenz-

signal wirklich von Singulett-Sauerstoff stammt, indem durch den Quencher die Besetzung des Singulett-Zustands schneller entleert wird und deswegen das Lumineszenzsignal eine kürzere Lebensdauer hat. In dieser Arbeit wurde Natriumazid (NaN_3) als Quencher für Singulett-Sauerstoff verwendet. Wegen seiner Effizienz, d.h. seiner großen Quenchingratenkonstante wird es oft als Werkzeug zum Nachweis von Singulett-Sauerstoff verwendet (siehe z.B. [MWS97]). Hierbei ist jedoch zu beachten, dass NaN_3 zusätzlich die Singulett- und Triplettzustände von Photosensibilisatoren zu quenchen vermag [B76].

Natriumazid dissoziiert in Wasser in ein Natriumkation Na^+ und in das, für Singulett-Sauerstoff funktionelle, Azidanion N_3^- , das in Abbildung 3.6 dargestellt ist. Natrium-

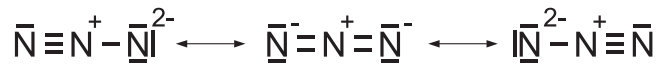


Abbildung 3.6: Strukturformel des Azidanions. Dargestellt sind die drei mesomeren Strukturen, die zu einer Stabilisierung führen.

azid hat eine molare Masse von 65,01 g/mol und wurde von Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland) bezogen. Die Reinheit beträgt 99 %.

3.5 Modell für die Erzeugung und Relaxation von Singulett-Sauerstoff

Zur Beschreibung der Zeitabhängigkeit der Konzentrationen des Triplett- T_1 -Zustandes des Photosensibilisators sowie des Singulett-Zustandes ($^1\text{O}_2$) des Sauerstoffs wird ein aus der Literatur bekanntes Standardmodell [PS84] verwendet. Dieses Modell wurde von Kilger *et al.* [KMS01] erweitert und, wie dort beschrieben, hier verwendet. Das Energieniveauschema, das dem verwendeten Differentialgleichungssystem zu Grunde liegt, ist in Abbildung 3.7 dargestellt. Gezeigt sind die zum Photosensibilisator gehörenden Zustände S_0 , S_1 und T_1 , der $^3\text{O}_2$ - und der $^1\text{O}_2$ -Zustand des Sauerstoffs, die Grundzustände des Lösungsmittels (LM) sowie eines evtl. vorhandenen Quenchers. Vibronische Anregungen werden nicht berücksichtigt. Gezeigt sind weiter die Relaxationsraten k_i [s^{-1}] des T_1 -Zustandes des Photosensibilisators und des $^1\text{O}_2$ -Zustandes des Sauerstoffs sowie die Übergangsratenkonstanten k_{ij} [$\text{s}^{-1}\text{M}^{-1}$]. Dieses Modell macht keine Aussage über die physikalische Natur der im Einzelnen ablaufenden Prozesse, sondern beschreibt phänomenologisch die Häufigkeit

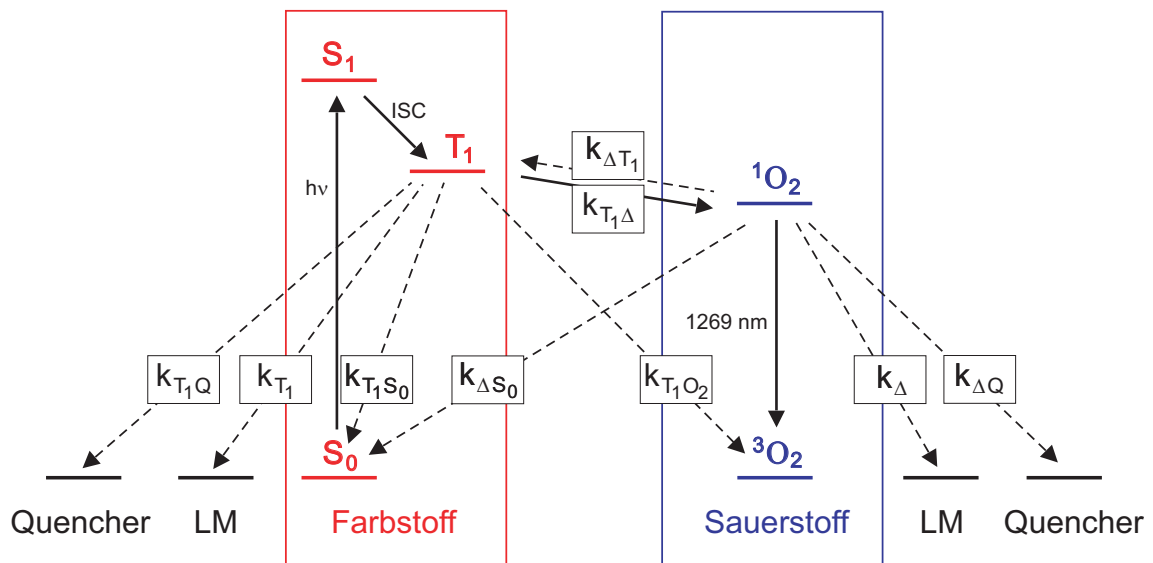


Abbildung 3.7: Schema des Ratengleichungsmodells. Dargestellt sind die Energieniveaus der Grundzustände des Photosensibilisators S_0 , des Sauerstoffs 3O_2 , des Lösungsmittels LM und des Quenchers, sowie die energetisch angeregten Zustände S_1 und T_1 des Photosensibilisators und der angeregte Zustand 1O_2 des Sauerstoffs.

der Prozesse. Jeder Prozess wird als Stoßprozess aufgefasst, wobei die Wechselwirkungshäufigkeit von der Konzentration der an der jeweiligen Reaktion beteiligten Moleküle abhängt.

Ziel ist es nun, mit dem Energieniveauschema die zeitliche Veränderung der Besetzung des Farbstoff-Triplett-Zustandes T_1 und des Sauerstoff-Singulett-Zustandes 1O_2 in einem gekoppelten Differentialgleichungssystem zu erfassen. Anschließend soll das System unter gewissen Näherungen analytisch gelöst werden. Dazu betrachten wir als Erstes die Prozesse, die den T_1 -Zustand des Photosensibilisators besetzen können:

- Besetzt wird der T_1 -Zustand im Wesentlichen über die Laseranregung. Ein Laserpuls regt den Photosensibilisator vom S_0 -Zustand in den S_1 -Zustand an, welcher dann über Inter System Crossing (ISC) sofort, im Vergleich zu den anderen hier verwendeten Reaktionen, in den T_1 -Zustand relaxiert. Es kann also angenommen werden, dass zur Zeit $t = 0 \mu s$, als Startbedingung des Systems, die Besetzung des T_1 -Zustandes abgeschlossen ist.
- Der Prozess $k_{\Delta T_1} [^1O_2][S_0]$ beschreibt den Rücktransfer von Energie vom angeregten Sauerstoffmolekül im Singulett-Zustand 1O_2 zum Photosensibilisator, der dadurch vom S_0 in den T_1 -Zustand angeregt wird. Die Ratenkonstante

$k_{\Delta T_1}$ [$s^{-1}M^{-1}$] beschreibt die Anzahl der ablaufenden Prozesse pro Sekunde im Einheitsvolumen. $[S_0]$ in Mol ist die Konzentration an Photosensibilisatoren im Grundzustand S_0 und $[^1O_2]$ in Mol die Konzentration an Singulett-Sauerstoff-Molekülen.

Betrachten wir nun die Prozesse die den T_1 -Zustand des Photosensibilisators deaktivieren:

- Der für uns wichtigste Prozess beschreibt die Erzeugung von Singulett-Sauerstoff durch einen Zusammenstoß mit einem Sauerstoffmolekül im Grundzustand. Dies wird durch $k_{T_1\Delta}[T_1][^3O_2]$ beschrieben.
- Natürlich ist eine Deaktivierung des T_1 -Zustandes durch Stöße mit Sauerstoffmolekülen im Grundzustand auch ohne die Generierung von Singulett-Sauerstoff möglich. Dies beschreibt $k_{T_1O_2}[T_1][^3O_2]$.
- $k_{T_1S_0}[T_1][S_0]$ beschreibt die Deaktivierung des angeregten Photosensibilisators durch Stöße mit anderen Photosensibilisatormolekülen im Grundzustand S_0 . Dieser Vorgang wird auch als Eigenquenchen bezeichnet.
- Da sich das gesamte System üblicherweise in einem Lösungsmittel befindet muss auch die Relaxation des T_1 -Zustandes durch Lösungsmittelmoleküle berücksichtigt werden. Dies geschieht durch den Prozess $k_{T_1}[T_1]$.
- Zusätzlich können Quencher in das System eingebracht werden, die den T_1 -Zustand durch Stöße mit den Quencher-molekülen entleeren. Die Anzahl der pro Sekunde in einer bestimmten Konzentration ablaufenden Reaktionen ist gegeben durch $k_{T_1Q}[T_1][Q]$.

Fasst man diese Prozesse zusammen, lässt sich eine lineare Differentialgleichung erster Ordnung für die zeitliche Änderung der Konzentration von Photosensibilisatoren im T_1 -Zustand aufstellen:

$$\frac{d[T_1]}{dt} = +k_{\Delta T_1}[^1O_2][S_0] - k_{T_1\Delta}[T_1][^3O_2] - k_{T_1O_2}[T_1][^3O_2] - k_{T_1S_0}[T_1][S_0] - k_{T_1}[T_1] - k_{T_1Q}[T_1][Q] \quad (3.4)$$

Analog zu den Betrachtungen bezüglich des T_1 -Zustandes des Photosensibilisators lassen sich die Prozesse, die den Singulett-Zustand des Sauerstoffs beeinflussen, betrachten. Als erstes soll auf den Prozess eingegangen werden, der den Singulett-Zustand besetzt:

- Für die Besetzung des Singulett-Zustand ist der bereits erwähnte wichtige Prozess $k_{T_1\Delta}[T_1][^3O_2]$ verantwortlich.

Betrachten wir jetzt die Prozesse, die den Singulett-Zustand des Sauerstoffmoleküls deaktivieren:

- Die Deaktivierung des Singulett-Zustandes durch Aussendung eines Lumineszenzphotons bei einer Wellenlänge von $\lambda = 1269 \text{ nm}$ ist für uns ein sehr wichtiger Prozess. Die Detektion dieser Photonen ermöglicht uns den direkten Nachweis von Singulett-Sauerstoff. Andererseits beträgt die Lebensdauer dieses Prozesses im Lösungsmittel einige Sekunden [SS03]. Aufgrund dieser vergleichsweise langen Zeit ist die Rate des Prozesses so klein, dass er im Ratengleichungssystem vernachlässigt werden kann.
- Der bereits erwähnte Energierücktransfer vom Singulett-Sauerstoff zum Photosensibilisator auf den T_1 -Zustand ist durch den Prozess $k_{\Delta T_1}[^1O_2][S_0]$ beschrieben.
- $k_{\Delta S_0}[^1O_2][S_0]$ beschreibt den Prozess, während dem der Singulett-Zustand vom Sauerstoff deaktiviert wird indem das angeregte Sauerstoffmolekül auf ein Farbstoffmolekül im Grundzustand S_0 stößt, ohne dabei in den T_1 -Zustand zu gelangen.
- Energieabgabe über Stoß kann auch mit dem Lösungsmittel geschehen. Der Prozess wird als $k_{\Delta}[^1O_2]$ dargestellt.
- Auch ein zusätzlich ins System eingebrachter Quencher kann eine Deaktivierung verursachen. $k_{\Delta Q}[^1O_2][Q]$ beschreibt diesen Prozess.

Analog zum T_1 -Zustand lässt sich auch hier eine lineare Differentialgleichung erster Ordnung für die zeitliche Änderung der Konzentration von Sauerstoffmolekülen im Singulett-Zustand aufstellen:

$$\begin{aligned} \frac{d[^1O_2]}{dt} = & +k_{T_1\Delta}[T_1][^3O_2] \\ & -k_{\Delta T_1}[^1O_2][S_0] - k_{\Delta S_0}[^1O_2][S_0] - k_{\Delta}[^1O_2] - k_{\Delta Q}[^1O_2][Q] \end{aligned} \quad (3.5)$$

Die beiden so erhaltenen Differentialgleichungen bilden ein Gleichungssystem das unser Problem der photodynamischen Generierung von Singulett-Sauerstoff be-

schreibt. Etwas zusammengefasst lässt sich das gekoppelte Differentialgleichungssystem wie folgt schreiben:

$$\begin{aligned}\frac{d[T_1]}{dt} &= -\left[k_{T_1} + (k_{T_1O_2} + k_{T_1\Delta})[{}^3O_2] + k_{T_1S_0}[S_0] + k_{T_1Q}[Q]\right][T_1] + k_{\Delta T_1}[S_0][{}^1O_2] \\ \frac{d[{}^1O_2]}{dt} &= -\left[k_{\Delta} + (k_{\Delta S_0} + k_{\Delta T_1})[S_0] + k_{\Delta Q}[Q]\right][{}^1O_2] + k_{T_1\Delta}[{}^3O_2][T_1]\end{aligned}\quad (3.6)$$

Zur Vereinfachung führt man noch die Gesamtrelaxationsraten K_{T_1} des T_1 -Zustandes des Farbstoffs und K_{Δ} des 1O_2 -Zustandes des Sauerstoffs ein:

$$K_{T_1} := k_{T_1} + (k_{T_1O_2} + k_{T_1\Delta})[{}^3O_2] + k_{T_1S_0}[S_0] + k_{T_1Q}[Q] \quad (3.7)$$

$$K_{\Delta} := k_{\Delta} + (k_{\Delta S_0} + k_{\Delta T_1})[S_0] + k_{\Delta Q}[Q] \quad (3.8)$$

Ist die Sättigungsintensität $I_{sat} = \frac{h\nu_L}{\sigma\tau_F}$ (hierbei ist h das Planck'sche Wirkungsquantum, $\nu_L = \frac{c_0}{\lambda_L}$ die Frequenz des Lasers, c_0 die Vakuumlichtgeschwindigkeit, λ_L die Laserwellenlänge, σ der Absorptionswirkungsquerschnitt bei λ_L und τ_F die Fluoreszenzlebensdauer des Photosensibilisators) [H67] für den Übergang $S_0 \rightarrow S_1$ groß gegen die Laserintensität, so kann die Konzentration an Photosensibilisator im Grundzustand $[S_0]$ für alle Zeiten näherungsweise gleich der Photosensibilisator-Konzentration in Lösung $[P]$ gesetzt werden. Ist weiterhin die Konzentration an Photosensibilisator im Triplett- T_1 -Zustand $[T_1]$ klein gegen die Sauerstoffkonzentration in Lösung $[O_2]$, so kann die Konzentration an Grundzustandssauerstoff $[{}^3O_2]$ näherungsweise gleich der Sauerstoffkonzentration $[O_2]$ gesetzt werden. Im Folgenden wird von der Gültigkeit dieser Näherungen, die bei der Durchführung der Experimente durch entsprechende Wahl der Laserintensität zu erreichen sind, ausgegangen. Somit lässt sich das Differentialgleichungssystem (3.6) und die Gleichungen (3.7) und (3.8) wie folgt vereinfachen:

$$\begin{aligned}\frac{d[T_1]}{dt} &= -K_{T_1}[T_1] + k_{\Delta T_1}[P][{}^1O_2] \\ \frac{d[{}^1O_2]}{dt} &= -K_{\Delta}[{}^1O_2] + k_{T_1\Delta}[O_2][T_1]\end{aligned}\quad (3.9)$$

$$K_{T_1} := k_{T_1} + (k_{T_1O_2} + k_{T_1\Delta})[O_2] + k_{T_1S_0}[P] + k_{T_1Q}[Q] \quad (3.10)$$

$$K_{\Delta} := k_{\Delta} + (k_{\Delta S_0} + k_{\Delta T_1})[P] + k_{\Delta Q}[Q] \quad (3.11)$$

Unter Voraussetzung dieser Näherungen kann das Differentialgleichungssystem (3.9) analytisch gelöst werden. Dazu wird die untere Differentialgleichung (3.9) nach

der Zeit abgeleitet. Anschließend wird die dabei entstehende zeitliche Ableitung von $[T_1]$ durch die obere Differentialgleichung von (3.9) ersetzt. Um den störenden Ausdruck $[T_1]$ zu eliminieren, wird die untere Differentialgleichung (3.9) nach $[T_1]$ aufgelöst und ebenfalls eingesetzt. Man erhält nun eine Differentialgleichung zweiter Ordnung, die wie folgt dargestellt werden kann:

$$\frac{d^2 [^1O_2]}{dt^2} + (K_\Delta + K_{T_1}) \frac{d[^1O_2]}{dt} + (K_\Delta K_{T_1} - k_{T_1\Delta}[O_2]k_{\Delta T_1}[P]) [^1O_2] = 0 \quad (3.12)$$

Diese Gleichung entspricht der Differentialgleichung eines gedämpften harmonischen Oszillators und kann mit dem exponentiellen Lösungsansatz $[^1O_2](t) \sim e^{-\beta t}$ gelöst werden. Für β_1 und β_2 erhält man so zwei linear unabhängige Lösungen:

$$\beta_{1,2} = \frac{1}{2} \left[K_{T_1} + K_\Delta \pm \sqrt{(K_{T_1} - K_\Delta)^2 + 4k_{T_1\Delta}[O_2]k_{\Delta T_1}[P]} \right], \beta_1 > \beta_2 \quad (3.13)$$

Somit lautet die allgemeine Lösung der Differentialgleichung (3.12) wie folgt:

$$[^1O_2](t) = Ae^{-\beta_1 t} + Be^{-\beta_2 t} \quad (3.14)$$

Die Konstanten A und B müssen nun durch die Anfangsbedingungen bestimmt werden. Dazu wird angenommen, dass zum Zeitpunkt $t = 0$ noch kein Singulett-Sauerstoff vorhanden ist, also $[^1O_2](t=0) = 0$. Als weitere Anfangsbedingung soll zum Zeitpunkt $t = 0$ die Besetzung des T_1 -Zustandes abgeschlossen sein, also $[T_1](t=0) = [T_1]_0 > 0$. Mit diesen Bedingungen kann die spezielle Lösung der Differentialgleichung (3.12) für den Verlauf der Singulett-Sauerstoff-Konzentration aufgestellt werden:

$$[^1O_2](t) = \frac{[T_1]_0 k_{T_1\Delta}[O_2]}{\beta_1 - \beta_2} (e^{-\beta_2 t} - e^{-\beta_1 t}) \quad (3.15)$$

β_1 und β_2 entsprechen dabei der Anstiegs- und Abklingrate der Konzentration des Singulett-Zustandes von Sauerstoff. Das experimentell zu beobachtende Lumineszenzsignal ist proportional zu $[^1O_2](t)$. Ist also $\beta_1 > \beta_2$, so ist der Anstieg der Singulett-Sauerstoff-Konzentration $[^1O_2]$ für $t \ll \frac{1}{\beta_1}$ durch β_1 bestimmt, für $t \gg \frac{1}{\beta_2}$ klingt $[^1O_2]$ exponentiell mit der Rate β_2 ab.

Analog zu den Überlegungen zur Herleitung von (3.15) kann auch der zeitliche Verlauf des T_1 -Zustandes aus dem Differentialgleichungssystem (3.9) wie folgt ermittelt werden:

$$[T_1](t) = \frac{[T_1]_0}{\beta_1 - \beta_2} [(\beta_1 - K_\Delta) e^{-\beta_1 t} + (K_\Delta - \beta_2) e^{-\beta_2 t}] \quad (3.16)$$

Abbildung 3.8 zeigt den prinzipiellen Verlauf von $[^1\text{O}_2](t)$ und $[T_1](t)$. Man erkennt,

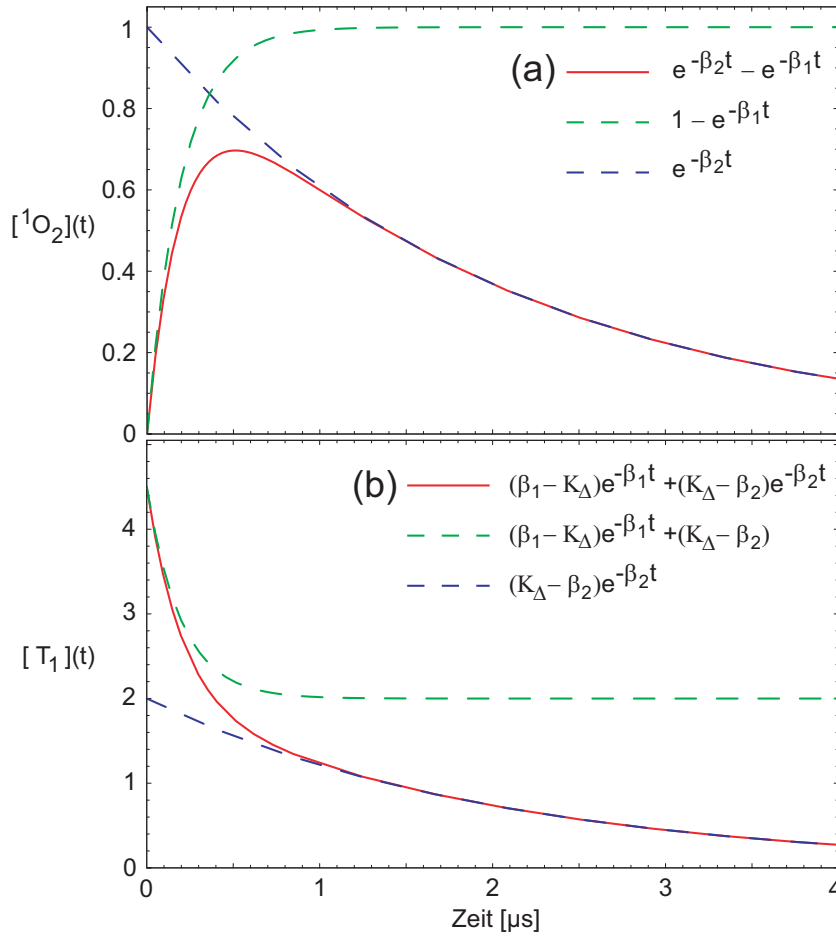


Abbildung 3.8: Illustration der Zusammensetzung des zeitliche Verlaufs der (a) Singulett-Sauerstoff-Konzentration $[^1\text{O}_2]$ und der (b) Triplett-Farbstoff-Konzentration $[T_1]$ für $\beta_1 = (0,2 \mu\text{s})^{-1}$, $\beta_2 = (2,0 \mu\text{s})^{-1}$ und $K_\Delta = (0,4 \mu\text{s})^{-1}$ aus der Summe der Exponentialfunktionen.

dass die Singulett-Sauerstoff-Konzentration zunächst mit einer Steigung anwächst, die der Exponentialfunktion $1 - e^{-\beta_1 t}$ entspricht, um dann mit der Rate β_2 abzuklingen, was bedeutet, dass der Verlauf der Exponentialfunktion $e^{-\beta_2 t}$ folgt. Ähnlich verhält es sich mit dem zeitlichen Verlauf der T_1 -Konzentration, wobei hier ein monoton fallender Verlauf vorliegt. Zuerst folgt die T_1 -Konzentration der Funktion $(\beta_1 - K_\Delta)e^{-\beta_1 t} + (K_\Delta - \beta_2)$ und fällt somit mit der Rate β_1 . Anschließend fällt die Funktion mit der Rate β_2 . Zusammenfassend lässt sich erkennen, dass der zeitliche Verlauf zu Beginn der größeren Rate β_1 folgt, während die kleinere Rate β_2 im Lauf der Zeit immer mehr an Bedeutung gewinnt und für lange Zeiten den Verlauf bestimmt.

Betrachten wir nun den Sonderfall $k_{\Delta T_1} = 0$. Es ist also kein Rücktransfer der Energie vom Singulett-Sauerstoff auf den T_1 -Zustand des Photosensibilisators möglich. Das ist der Fall, wenn der Energieabstand zwischen dem T_1 -Niveau, des Photo-

sensibilisators, und dem $^1\text{O}_2$ -Niveau, des Singulett-Sauerstoffs, sehr groß ist. Die Definitionen (3.10) und (3.11) verändern sich für diesen Spezialfall wie folgt:

$$K_{T_1, oR} = K_{T_1} = k_{T_1} + (k_{T_1 O_2} + k_{T_1 \Delta})[O_2] + k_{T_1 S_0}[P] + k_{T_1 Q}[Q] \quad (3.17)$$

$$K_{\Delta, oR} = K_{\Delta}(k_{\Delta T_1} = 0) = k_{\Delta} + k_{\Delta S_0}[P] + k_{\Delta Q}[Q] \quad (3.18)$$

Die Raten β_1 und β_2 aus Gleichung (3.13) lassen sich nun einfach umschreiben, da der Term $4k_{T_1 \Delta}[O_2]k_{\Delta T_1}[P] = 0$ ist:

$$\beta_{1,2} = \frac{1}{2} [K_{T_1} + K_{\Delta, oR} \pm |K_{T_1} - K_{\Delta, oR}|], \beta_1 > \beta_2 \quad (3.19)$$

Womit die Raten eine einfache Form annehmen:

$$\beta_1 = \begin{cases} K_{T_1} & \text{für } K_{T_1} > K_{\Delta, oR} \\ K_{\Delta, oR} & \text{für } K_{T_1} < K_{\Delta, oR} \end{cases} \quad (3.20)$$

$$\beta_2 = \begin{cases} K_{\Delta, oR} & \text{für } K_{T_1} > K_{\Delta, oR} \\ K_{T_1} & \text{für } K_{T_1} < K_{\Delta, oR} \end{cases}$$

Für diesen Fall ist die Anstiegsrate β_1 der Singulett-Sauerstoff-Besetzung ebenfalls immer größer als die Deaktivierungsrate β_2 des Singulett-Sauerstoff-Zustandes.

Als Lösung des Gleichungssystems (3.9) für $k_{\Delta T_1} = 0$ ergibt sich dann für den Verlauf der Singulett-Sauerstoff-Konzentration $[^1\text{O}_2]$:

$$[^1\text{O}_2](t) = \begin{cases} \frac{[T_1]_0 k_{T_1 \Delta} [O_2]}{K_{T_1} - K_{\Delta, oR}} (e^{-K_{\Delta, oR} t} - e^{-K_{T_1} t}) & \text{für } K_{T_1} \neq K_{\Delta, oR} \\ [T_1]_0 k_{T_1 \Delta} [O_2] t e^{-K_{\Delta, oR} t} & \text{für } K_{T_1} = K_{\Delta, oR} \end{cases} \quad (3.21)$$

Betrachtet sei nun der Fall $K_{T_1} \neq K_{\Delta, oR}$. Gilt $K_{T_1} > K_{\Delta, oR}$, so ist der Anstieg der Singulett-Sauerstoff-Konzentration $[^1\text{O}_2]$ für $t \ll \frac{1}{K_{T_1}}$ durch K_{T_1} bestimmt, für $t \gg \frac{1}{K_{\Delta, oR}}$ klingt $[^1\text{O}_2]$ exponentiell mit der Rate $K_{\Delta, oR}$ ab. Im Fall $K_{T_1} = K_{\Delta, oR}$ steigt für $t \ll \frac{1}{K_{\Delta, oR}}$ die Singulett-Sauerstoff-Konzentration $[^1\text{O}_2]$ linear mit der Zeit an und klingt exponentiell mit der Rate $K_{\Delta, oR}$ ab.

Der Verlauf der Triplett-Farbstoff-Konzentration $[T_1]$ lässt sich durch Lösen des Gleichungssystems (3.9) für $k_{\Delta T_1} = 0$ ebenfalls bestimmen:

$$[T_1](t) = [T_1]_0 e^{-K_{T_1} t} \quad (3.22)$$

Die Triplett-Farbstoff-Konzentration $[T_1]$ nimmt also exponentiell mit der Rate K_{T_1} im Laufe der Zeit t ab.

3.6 Ermittlung der Raten und Ratenkonstanten

Mit dem experimentellen Aufbau aus Abschnitt 4.1 ist es möglich, die zeitliche Besetzung von Singulett-Sauerstoff-Zuständen nach Gleichung (3.15) zu bestimmen. Durch Gleichung (3.15) können β_1 und β_2 für das untersuchte System bestimmt werden. Die Raten und Ratenkonstanten unseres Ratengleichungsmodells 3.7 sind mit β_1 und β_2 über die Gleichungen (3.10), (3.11) und (3.13) verbunden. Durch Variation der Farbstoff-, Sauerstoff- und Quencher-Konzentration sowie einer geeigneten Auftragung ist es nun möglich, die Raten und Ratenkonstanten zu bestimmen.

3.6.1 Ohne Energierücktransfer ($k_{\Delta T_1} = 0$)

Zuerst soll der Fall untersucht werden, dass kein Rücktransfer ($k_{\Delta T_1} = 0$) stattfindet. Wie in Gleichung (3.20) beschrieben gilt für die Rate β_1 , dass $\beta_1 = K_{T_1}$ für $K_{\Delta,OR} < K_{T_1}$ und $\beta_1 = K_{\Delta,OR}$ für $K_{\Delta,OR} > K_{T_1}$. Für β_2 gilt der umgekehrte Fall.

In Abbildung 3.9 sind die Raten β_1 und β_2 für ein konstruiertes System, Singulett-Sauerstoff in H_2O ohne Quencher, gegen die Farbstoff-Konzentration p aufgetragen. Die Sauerstoff-Konzentration sei konstant mit $[O_2] = 0,27 \text{ mM}$. Für diesen Fall lässt

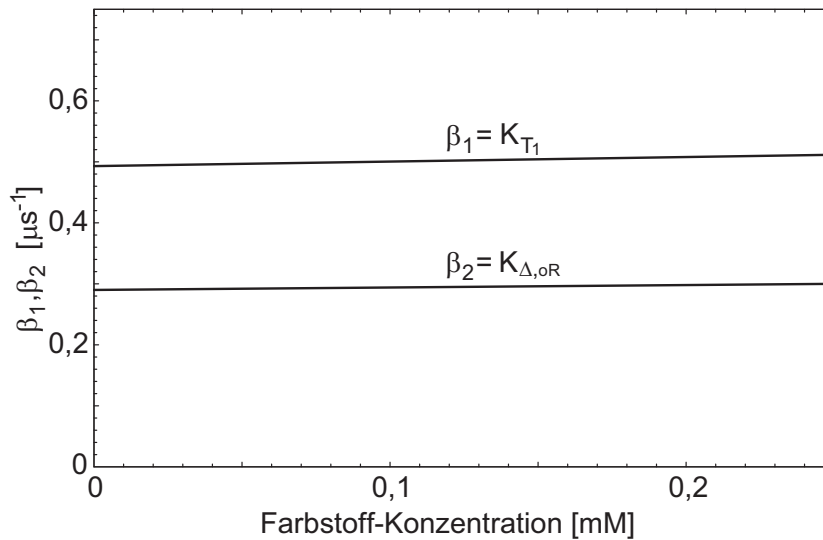


Abbildung 3.9: Verlauf der Raten β_1 und β_2 in Abhängigkeit von der Farbstoff-Konzentration ohne Energierücktransfer ($k_{\Delta T_1} = 0$).

sich β_1 und β_2 für $K_{\Delta,OR} < K_{T_1}$ wie folgt darstellen:

$$\beta_1(p) = K_{T_1}(p) = k_{T_1} + (k_{T_1 O_2} + k_{T_1 \Delta})[O_2] + k_{T_1 S_0} \cdot p \quad (3.23)$$

$$\beta_2(p) = K_{\Delta,OR}(p) = k_{\Delta} + k_{\Delta S_0} \cdot p \quad (3.24)$$

Die Steigung der Geraden $K_{T_1}(p)$ entspricht der Rate $k_{T_1S_0}$ und die Steigung von $K_{\Delta,OR}(p)$ entspricht $k_{\Delta S_0}$. Der y-Achsen-Abschnitt entspricht für $K_{T_1}(p)$ der Summe $K_{T_1}(0) = k_{T_1} + (k_{T_1O_2} + k_{T_1\Delta})[O_2]$ und für $K_{\Delta,OR}(p)$ der Ratenkonstanten $K_{\Delta,OR}(0) = k_{\Delta}$, die der Lebensdauer von Singulett-Sauerstoff im Lösungsmittel ohne quencheden Farbstoff entspricht.

In Abbildung 3.10 ist der Verlauf der Raten β_1 (gestrichelte Linie) und β_2 (durchgezogene Linie) in Abhängigkeit von der Sauerstoff-Konzentration o dargestellt. Dieses

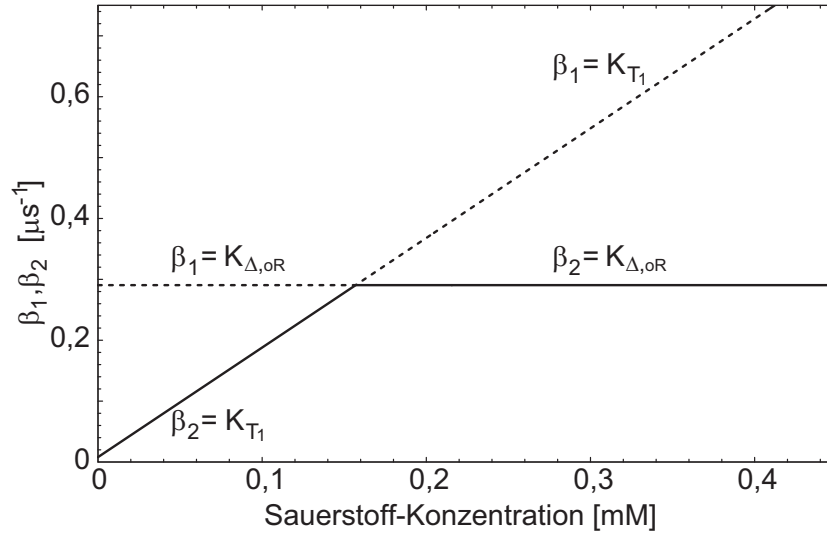


Abbildung 3.10: Verlauf der Raten β_1 und β_2 in Abhängigkeit von der Sauerstoff-Konzentration ohne Energierücktransfer ($k_{\Delta T_1} = 0$).

konstruierte System hat eine Farbstoff-Konzentration $[P] = 0,1$ mM und es wurde kein Quencher verwendet $[Q] = 0$. Für $K_{\Delta,OR} < K_{T_1}$ lassen sich β_1 und β_2 wie folgt darstellen:

$$\beta_1(o) = K_{T_1}(o) = k_{T_1} + k_{T_1S_0}[P] + (k_{T_1O_2} + k_{T_1\Delta}) \cdot o \quad (3.25)$$

$$\beta_2(o) = K_{\Delta,OR}(o) = k_{\Delta} + k_{\Delta S_0}[P] \quad (3.26)$$

$K_{T_1}(o)$ steigt linear mit der Sauerstoff-Konzentration an. Die Steigung wird durch die Summe der Raten $k_{T_1O_2} + k_{T_1\Delta}$ beschrieben. Der y-Achsen-Abschnitt entspricht der Summe der Raten $K_{T_1}(0) = k_{T_1} + k_{T_1S_0}[P]$. Da die Rate $k_{T_1S_0}$ durch die Farbstoff-Variation (Gleichung (3.23)) bekannt ist, lässt sich k_{T_1} eindeutig bestimmen. $K_{\Delta,OR}(o)$ ist unabhängig von der Sauerstoff-Konzentration und entspricht somit am y-Achsen-Abschnitt der Summe $K_{\Delta,OR}(0) = k_{\Delta} + k_{\Delta S_0}[P]$. Die Ratenkonstanten k_{Δ} und $k_{\Delta S_0}$ sind bereits durch die Farbstoff-Variation bekannt.

Bringt man zusätzlich noch Quencher in das zu untersuchende System, kann man

eine Quencher-Variation durchführen, um den Einfluss des Quenchers auf das System zu ermitteln. In Abbildung 3.11 ist der Verlauf der Raten β_1 (gestrichelte Linie) und β_2 (durchgezogene Linie) in Abhängigkeit von der Quencher-Konzentration q dargestellt. Dieses konstruierte System hat eine definierte Farbstoff- $[P] = 0,1 \text{ mM}$

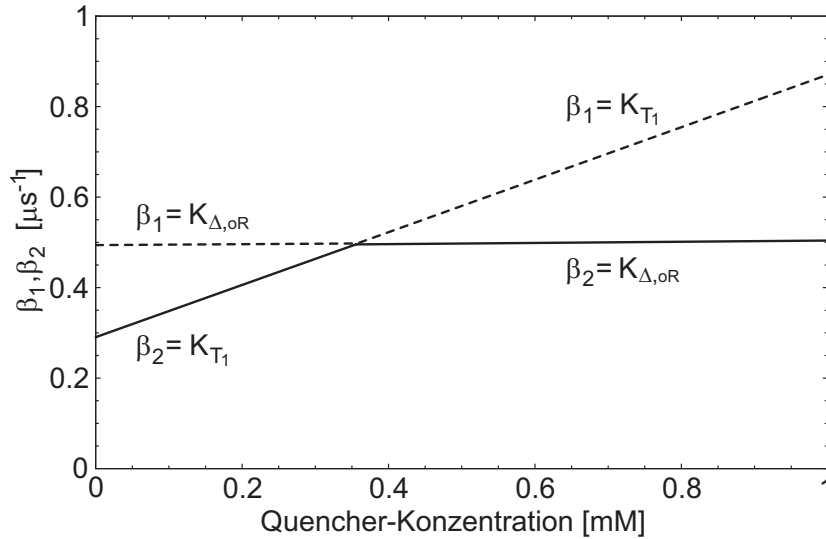


Abbildung 3.11: Verlauf der Raten β_1 und β_2 in Abhängigkeit von der Quencher-Konzentration ohne Energierücktransfer ($k_{\Delta T_1} = 0$).

und Sauerstoff-Konzentration $[O_2] = 0,27 \text{ mM}$. Gilt $K_{\Delta,oR} < K_{T_1}$, so lassen sich β_1 und β_2 wie folgt darstellen:

$$\beta_1(q) = K_{T_1}(q) = k_{T_1} + k_{T_1 S_0}[P] + (k_{T_1 O_2} + k_{T_1 \Delta})[O] + k_{T_1 Q} \cdot q \quad (3.27)$$

$$\beta_2(q) = K_{\Delta,oR}(q) = k_{\Delta} + k_{\Delta S_0}[P] + k_{\Delta Q} \cdot q \quad (3.28)$$

Die Steigung der Geraden $K_{T_1}(q)$ entspricht der Rate $k_{T_1 Q}$ und die Steigung von $K_{\Delta,oR}(q)$ entspricht $k_{\Delta Q}$. Der Fall $q = 0$ wurde schon durch die Farbstoff- und Sauerstoff-Variation behandelt.

3.6.2 Mit Energierücktransfer ($k_{\Delta T_1} > 0$)

Für den Fall, dass ein Energierücktransfer stattfindet ($k_{\Delta T_1} > 0$) ist die Bestimmung der Raten und Ratenkonstanten wesentlich schwieriger. β_1 und β_2 sind gegeben durch Gleichung (3.13).

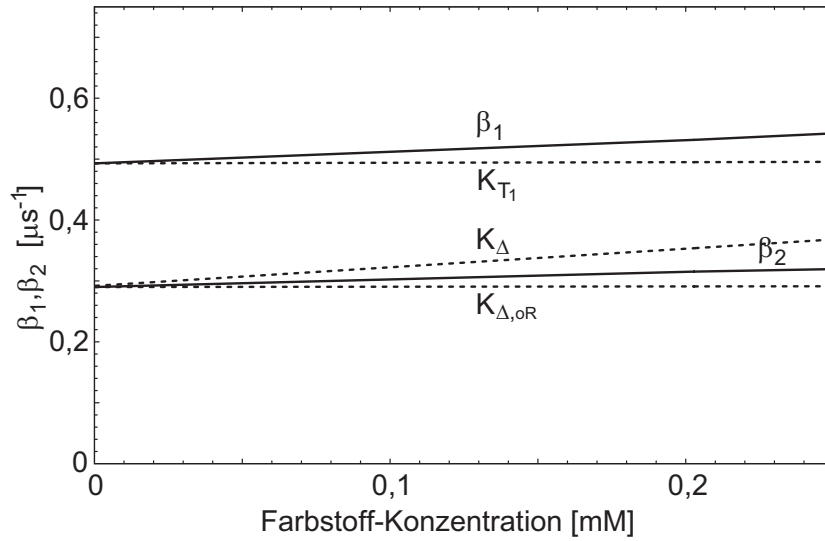


Abbildung 3.12: Verlauf der Raten β_1 und β_2 (durchgezogene Linien) in Abhängigkeit von der Farbstoff-Konzentration mit Energierücktransfer ($k_{\Delta T_1} > 0$).

Abbildung 3.12 zeigt die Raten β_1 und β_2 für ein konstruiertes System, Singulett-Sauerstoff in H_2O ohne Quencher, gegen die Farbstoff-Konzentration. Die Sauerstoff-Konzentration sei konstant mit $[O_2] = 0,27 \text{ mM}$. Zur Orientierung wurden die Raten K_{T_1} , K_{Δ} und $K_{\Delta, oR}$ gestrichelt eingezeichnet. K_{T_1} und $K_{\Delta, oR}$ entsprechen im Verlauf den Gleichungen (3.23) und (3.24). K_{Δ} hat gegenüber $K_{\Delta, oR}$ eine größere Steigung, da die Steigung von beiden Raten durch die Summe $k_{\Delta S_0} + k_{\Delta T_1}$ gegeben ist und bei $K_{\Delta, oR}$ die Ratenkonstante $k_{\Delta T_1} = 0$ ist. Für β_1 und β_2 lässt sich hingegen kein genereller Wert für die Steigung angeben. Die Abweichung von β_1 und β_2 gegenüber K_{T_1} und $K_{\Delta, oR}$ ist durch den Rücktransfer gegeben. Für $k_{\Delta T_1} = 0$ entsprechen β_1 und β_2 den Raten K_{T_1} und $K_{\Delta, oR}$. Für steigendes $k_{\Delta T_1}$ nimmt die Abweichung von β_1 und β_2 gegenüber K_{T_1} und $K_{\Delta, oR}$ immer stärker zu. Für den Fall, dass kein Photosensibilisator vorhanden ist $[P] = 0$, entspricht $\beta_1([P] = 0) = K_{T_1}([P] = 0)$ und $\beta_2([P] = 0) = K_{\Delta}([P] = 0) = K_{\Delta, oR}([P] = 0)$ für $K_{\Delta, oR} < K_{T_1}$. Somit gilt für den y-Achsen-Abschnitt, dass $\beta_1([P] = 0) = k_{T_1} + (k_{T_1 O_2} + k_{T_1 \Delta})[O_2]$ und $\beta_2([P] = 0) = k_{\Delta}$ ist.

In Abbildung 3.13 ist der Verlauf der Raten β_1 und β_2 in Abhängigkeit von der Sauerstoff-Konzentration dargestellt. Dieses konstruierte System hat eine definierte Farbstoff-Konzentration $[P] = 0,1 \text{ mM}$ und es wurde kein Quencher verwendet $[Q] = 0$. Um den Verlauf besser zu verstehen, betrachten wir zunächst Gleichung (3.13). Für die Wurzel gilt:

$$\sqrt{(K_{T_1} - K_{\Delta})^2 + 4k_{T_1 \Delta}[O_2] \cdot k_{\Delta T_1}[F]} > |K_{T_1} - K_{\Delta}| \quad (3.29)$$

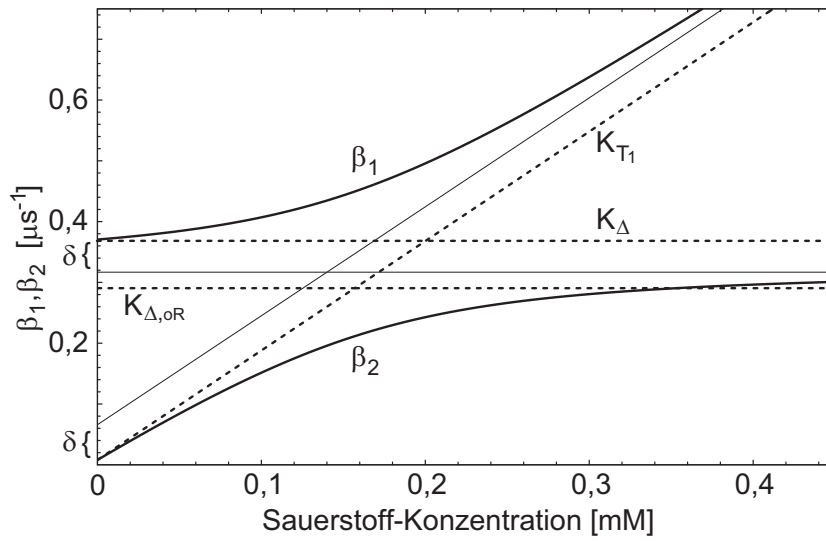


Abbildung 3.13: Verlauf der Raten β_1 und β_2 in Abhängigkeit von der Sauerstoff-Konzentration mit Energierücktransfer ($k_{\Delta T_1} > 0$).

Dies bedeutet aber, dass β_1 immer größer als K_{T_1} oder K_{Δ} ist bzw. β_2 immer kleiner als K_{T_1} oder K_{Δ} . Dies führt zur Aufspaltung der Raten β_1 und β_2 , wie in Abbildung 3.13 dargestellt. Zusätzlich wurden die Raten K_{T_1} , K_{Δ} und $K_{\Delta,OR}$ gestrichelt eingezeichnet. K_{T_1} und $K_{\Delta,OR}$ entsprechen im Verlauf den Gleichungen (3.23) und (3.24). K_{Δ} hat gegenüber $K_{\Delta,OR}$ einen größeren Wert, da für K_{Δ} die Ratenkonstante $k_{\Delta T_1} > 0$ ist.

Betrachten wir nun den Verlauf von β_1 . Für $[O_2] = 0$ gilt, dass $\beta_1([O_2] = 0) = K_{\Delta}([O_2] = 0)$ ist. Dies ist ersichtlich, da der Term $4k_{T_1\Delta}[O_2]k_{\Delta T_1}[F]$ in Gleichung (3.13) für $[O_2] = 0$ verschwindet. Somit gilt, dass $\beta_1([O_2] = 0) = k_{\Delta} + (k_{\Delta S_0} + k_{\Delta T_1})[P]$ ist. Für hohe Sauerstoff-Konzentrationen gilt für β_1 :

$$\beta_1 \approx K_{T_1}(o) + \frac{k_{T_1\Delta}k_{\Delta T_1}[P]}{k_{T_1O_2} + k_{T_1\Delta}} \quad (3.30)$$

$K_{T_1}(o)$ entspricht dabei Gleichung (3.25). Für hohe Sauerstoff-Konzentrationen o läuft β_1 also parallel zu $K_{T_1}(o)$, allerdings um eine Konstante δ nach oben verschoben (vgl. Abbildung 3.13).

$$\delta = \frac{k_{T_1\Delta}k_{\Delta T_1}[P]}{k_{T_1O_2} + k_{T_1\Delta}} \quad (3.31)$$

Das bedeutet aber auch, dass für hohe Sauerstoff-Konzentrationen die Steigung von β_1 gleich der Steigung von $K_{T_1}(o)$ ist. Die Steigung von β_1 ist somit $k_{T_1O_2} + k_{T_1\Delta}$.

Im Folgenden wird nun der Verlauf von β_2 betrachtet. Für $[O_2] = 0$ gilt, dass $\beta_2([O_2] = 0) = K_{T_1}([O_2] = 0)$ ist, da der Term $4k_{T_1\Delta}[O_2]k_{\Delta T_1}[F]$ für $[O_2] = 0$ wieder verschwindet. Somit ist $\beta_2([O_2] = 0) = k_{T_1} + k_{T_1S_0}[F]$. Für hohe Sauerstoff-

Konzentrationen gilt für β_2 :

$$\beta_2 \approx K_\Delta - \frac{k_{T_1\Delta}k_{\Delta T_1}[P]}{k_{T_1O_2} + k_{T_1\Delta}} = K_\Delta - \delta \quad (3.32)$$

K_Δ entspricht dabei Gleichung (3.11) für $[Q] = 0$. β_2 verläuft also für hohe Sauerstoff-Konzentrationen parallel zu K_Δ , allerdings um die Konstante δ nach unten verschoben (vgl. Abbildung 3.13).

Mit Hilfe von δ und Gleichung (3.31) lässt sich die Rücktransfer-Rate $k_{\Delta T_1}$ nach unten abschätzen:

$$k_{\Delta T_1} \geq \frac{\delta}{[P]} \quad (3.33)$$

Die Gleichheit gilt für den Fall, dass $k_{T_1O_2} = 0$ ist, also das Triplett-Niveau des Farbstoffes durch Sauerstoff nur unter Bildung eines Singulett-Sauerstoff-Moleküls deaktiviert wird. Ist $k_{T_1O_2} > 0$ wird δ kleiner und damit muss die Rücktransfer-Rate $k_{\Delta T_1}$ größer als $\delta/[P]$ sein.

Als Maß für die Aufspaltung kann der Abstand $\beta_1 - \beta_2$ an der Stelle $K_{T_1} = K_\Delta$ betrachtet werden. Für diesen gilt:

$$\beta_1 - \beta_2 = \sqrt{4k_{T_1\Delta}[O_2]k_{\Delta T_1}[P]} \quad (3.34)$$

Die Aufspaltung bzw. der Abstand steigt mit steigendem $k_{\Delta T_1}$ und verschwindet bei $k_{\Delta T_1} = 0$, wenn kein Energierücktransfer vom Singulett-Sauerstoff auf den Farbstoff vorhanden ist.

Der Verlauf der Raten β_1 und β_2 in Abhängigkeit von der Quencher-Konzentration ist in Abbildung 3.14 dargestellt. Dieses konstruierte System hat eine definierte Farbstoff- $[P] = 0,1$ mM und Sauerstoff-Konzentration $[O_2] = 0,27$ mM. Es wird angenommen, dass die Rate $k_{\Delta Q} > k_{T_1Q}$ ist. Dies ist deshalb gerechtfertigt, da hier nur Quencher untersucht werden, die die Lebensdauer von Singulett-Sauerstoff und nicht die des Triplett-Photosensibilisators quenchen sollen. Analog zur Sauerstoff-Variation ist auch hier in Abbildung 3.14 eine Aufspaltung zu sehen und es gilt, dass β_1 immer größer als K_{T_1} oder K_Δ ist bzw. β_2 immer kleiner als K_{T_1} oder K_Δ . Für $[Q] = 0$ entspricht dieses System dem Zustand der Sauerstoff-Variation bei $[O_2] = 0,27$ mM (vgl. Abbildung 3.13). Die Raten β_1 und β_2 entsprechen deshalb auch den dort ermittelten Raten $\beta_1([O_2] = 0,27; [Q] = 0)$ und $\beta_2([O_2] = 0,27; [Q] = 0)$. Analog gilt das ebenfalls für K_{T_1} , K_Δ und $K_{\Delta, \rho R}$. Für große Quencher-Konzentrationen steigt β_1 mit der Steigung $k_{\Delta Q}$ parallel zu K_Δ an. β_2 hingegen steigt mit der Steigung k_{T_1Q} parallel zu K_{T_1} an.

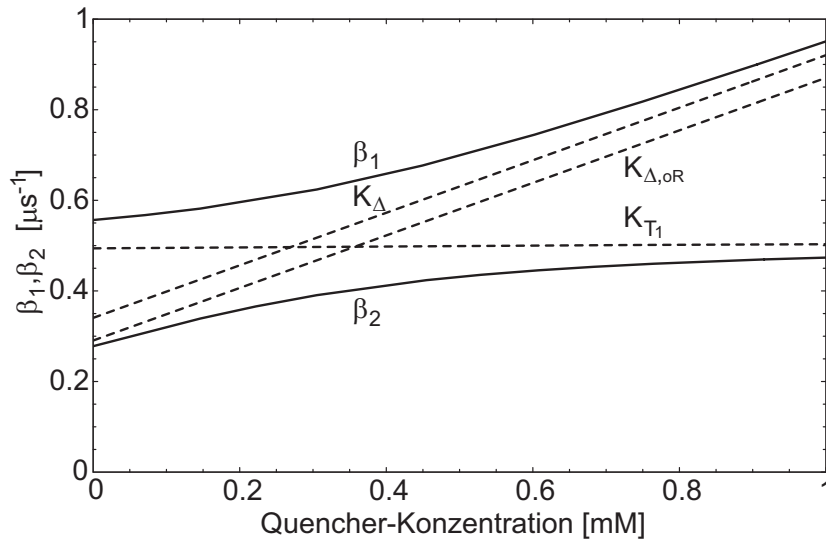


Abbildung 3.14: Verlauf der Raten β_1 und β_2 in Abhängigkeit von der Quencher-Konzentration mit Energierücktransfer ($k_{\Delta T_1} > 0$).

3.6.3 Eindeutigkeit der Ratenbestimmung

Ohne Rücktransfer lässt sich zusammenfassend sagen, dass die Raten und Ratenkonstanten k_{T_1} , $k_{T_1 S_0}$, $k_{T_1 Q}$, k_{Δ} , $k_{\Delta S_0}$ und $k_{\Delta Q}$ durch die Variation der Farbstoff-, Sauerstoff- und Quencher-Konzentration eindeutig bestimmt werden können. Die Raten $k_{T_1 O_2}$ und $k_{T_1 \Delta}$ hingegen können nur gemeinsam als Summe

$$k_{T_1 O}^{\Sigma} = k_{T_1 O_2} + k_{T_1 \Delta} \quad (3.35)$$

bestimmt werden.

Mit Rücktransfer lassen sich nur die Raten und Ratenkonstanten k_{T_1} , $k_{T_1 S_0}$, $k_{T_1 Q}$, k_{Δ} und $k_{\Delta Q}$ eindeutig bestimmen. Die restlichen Raten ($k_{\Delta S_0}$, $k_{T_1 O_2}$, $k_{T_1 \Delta}$ und $k_{\Delta T_1}$) lassen sich nur durch Summen und ein Produkt angeben. Neben Gleichung (3.35) sind das noch folgende Gleichungen:

$$k_{\Delta P}^{\Sigma} = k_{\Delta S_0} + k_{\Delta T_1} \quad (3.36)$$

$$k_{\Delta T_1}^{\Pi} = k_{T_1 \Delta} \cdot k_{\Delta T_1} \quad (3.37)$$

Durch die Summen und das Produkt lassen sich für die einzelnen Raten nur Ober- und Untergrenzen angeben und keine exakten Werte.

3.7 Die Singulett-Sauerstoff-Quantenausbeute Φ_{Δ}

Die Singulett-Sauerstoff-Quantenausbeute Φ_{Δ} beschreibt die Fähigkeit eines bestimmten Photosensibilisators Singulett-Sauerstoff zu generieren. Die folgenden Definitionen beruhen auf der in Abschnitt 3.5 eingeführten Theorie.

3.7.1 Direkte Bestimmung von Φ_{Δ}

Vernachlässigt man, aufgrund der kurzen Lebensdauer des S_1 -Zustandes des Photosensibilisators, einen Energietransfer von diesem auf den Sauerstoff, so gilt nach [WHR95] für die Quantenausbeute an Singulett-Sauerstoff:

$$\Phi_{\Delta}([O_2]) = \Phi_{T_1} f_{\Delta}^{T_1} P_{T_1}([O_2]) \quad (3.38)$$

Hierbei ist Φ_{T_1} die Triplett- T_1 -Quantenausbeute des Photosensibilisators, welche wie folgt definiert ist:

$$\Phi_{T_1} = \frac{k_{ISC}}{k_{S_1}} \quad (3.39)$$

Dabei beschreibt k_{ISC} die Relaxationsrate des Übergangs des Photosensibilisators vom S_1 -Zustand auf den T_1 -Zustand (vergleiche Abbildung 3.7) und k_{S_1} die Gesamterelaxationsrate des Singulett- S_1 -Zustandes des Photosensibilisators. Der Anteil an T_1 -Zuständen, die durch die Wechselwirkung mit Sauerstoff deaktiviert werden und dabei Singulett-Sauerstoff erzeugen, ist gegeben durch:

$$f_{\Delta}^{T_1} = \frac{k_{T_1\Delta}}{k_{T_1O_2} + k_{T_1\Delta}} \quad (3.40)$$

Der Anteil der T_1 -Zustände, die durch die Wechselwirkung mit Sauerstoff relaxieren, ist von der Sauerstoff-Konzentration abhängig und für $k_{\Delta T_1} = 0$ gegeben durch:

$$P_{T_1}([O_2]) = \frac{(k_{T_1O_2} + k_{T_1\Delta})[O_2]}{K_{T_1}} \quad (3.41)$$

Somit lässt sich die Sauerstoff-Quantenausbeute Φ_{Δ} zusammenfassen zu:

$$\Phi_{\Delta}([O_2]) = \Phi_{T_1} \frac{k_{T_1\Delta}[O_2]}{K_{T_1}} \quad (3.42)$$

Diese Definition der Singulett-Sauerstoff-Quantenausbeute Φ_{Δ} , ist jedoch nur haltbar für den Fall, dass $k_{\Delta T_1} = 0$ gilt, da für $k_{\Delta T_1} > 0$ in der Lösung der Differentialgleichung (3.9) β_1 anstelle von K_{T_1} und β_2 anstelle von K_{Δ} tritt.

Um für den Fall, dass $k_{\Delta T_1} > 0$ ist, eine sinnvolle Definition der Quantenausbeute Φ_{Δ} zu finden, werden folgende Überlegungen angestellt. Betrachtet sei die mittlere Konzentration des Singulett-Sauerstoffs innerhalb dessen Lebensdauer $\tau_{\Delta} = 1/K_{\Delta}$, zunächst für $k_{\Delta T_1} = 0$:

$$\begin{aligned} \frac{1}{\tau_{\Delta}} \int_0^{\infty} [^1O_2] dt &= K_{\Delta}[T_1]_0 \int_0^{\infty} \frac{k_{T_1\Delta}[O_2]}{K_{T_1} - K_{\Delta}} (e^{-K_{\Delta}t} - e^{-K_{T_1}t}) dt \\ &= K_{\Delta}[T_1]_0 \frac{k_{T_1\Delta}[O_2]}{K_{T_1}K_{\Delta}} = [T_1]_0 f_{\Delta}^{T_1} P_{T_1}([O_2]) \end{aligned} \quad (3.43)$$

Analog gilt für den Fall $k_{\Delta T_1} > 0$ folgendes:

$$\begin{aligned} \beta_2 \int_0^{\infty} [^1O_2] dt &= \beta_2[T_1]_0 \int_0^{\infty} \frac{k_{T_1\Delta}[O_2]}{\beta_1 - \beta_2} (e^{-\beta_2 t} - e^{-\beta_1 t}) dt \\ &= \beta_2[T_1]_0 \frac{k_{T_1\Delta}[O_2]}{\beta_1\beta_2} \end{aligned} \quad (3.44)$$

Der Vergleich der erhaltenen Gleichungen (3.43) und (3.44) zeigt, dass folgende Definition von $f_{\Delta}^{T_1} P_{T_1}([O_2])$ sinnvoll ist:

$$f_{\Delta}^{T_1} P_{T_1}([O_2]) = \frac{k_{T_1\Delta}[O_2]}{\beta_1} \quad (3.45)$$

Somit lässt sich die Singulett-Sauerstoff-Quantenausbeute Φ_{Δ} für $k_{\Delta T_1} > 0$ wie folgt angeben:

$$\Phi_{\Delta}([O_2]) = \Phi_{T_1} \frac{k_{T_1\Delta}[O_2]}{\beta_1} \quad (3.46)$$

Ist nun Φ_{T_1} bekannt, lässt sich durch Bestimmung der Raten K_{T_1} bzw. β_1 und $k_{T_1\Delta}$ nach Abschnitt 3.6 die Singulett-Sauerstoff-Quantenausbeute Φ_{Δ} bestimmen. Beachtenswert ist die Sauerstoffabhängigkeit von Φ_{Δ} . In Abbildung 3.15 ist der sauerstoffabhängige Verlauf von Φ_{Δ} , für den Fall $k_{T_1O_2} = 0$, schematisch dargestellt. Für die Triplett-Quantenausbeute wurde $\Phi_{T_1} = 1$ angenommen. Für kleine Sauerstoffkonzentrationen ist zu erkennen, dass Φ_{Δ} gegen Null geht. Anschaulich lässt sich dieser Effekt so erklären, dass die Wahrscheinlichkeit Singulett-Sauerstoff zu generieren immer kleiner wird, umso weniger Sauerstoff vorhanden ist. Der Faktor $k_{T_1\Delta}[O_2]$, der sowohl in β_1 und K_{T_1} vorhanden ist, beginnt bei hohen Sauerstoffkonzentrationen zu dominieren. Somit nähert sich $\frac{k_{T_1\Delta}[O_2]}{\beta_1}$ bzw. $\frac{k_{T_1\Delta}[O_2]}{K_{T_1}}$ dem Wert 1 und damit Φ_{Δ} dem Wert Φ_{T_1} an.

Im Folgenden seien noch in Tabelle 3.1 Literaturwerte der Triplett- T_1 -Quantenausbeuten Φ_{T_1} sowie der Singulett-Sauerstoff-Quantenausbeuten Φ_{Δ} der im Rahmen

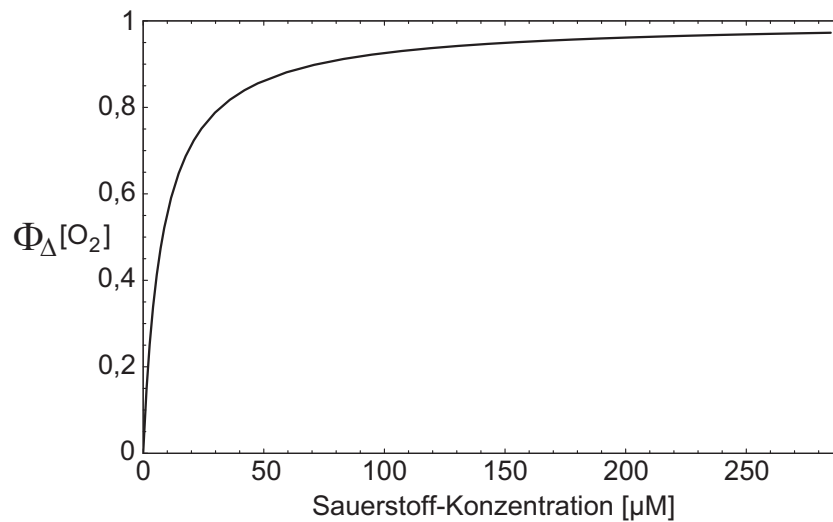


Abbildung 3.15: Schematischer Verlauf der Singulett-Sauerstoff-Quantenausbeute Φ_{Δ} gegen die Sauerstoffkonzentration.

der vorliegenden Arbeit verwendeten Photosensibilisatoren gezeigt. Es sei jedoch ausdrücklich erwähnt, dass in allen Literaturstellen keine explizite Angabe zur Sauerstoffkonzentration in Lösung gemacht wird.

Farbstoff	Lösungsmittel	Φ_{T_1}	Φ_{Δ}	Quelle
ATMPn ^a	Toluol	0,43	0,37	[BMM97]
Photofrin ^a	H ₂ O	0,74	0,36	[PT86]
PN ^b	Methanol	1	0,98±0,08	[STD94]
PNS ^b	H ₂ O	1	0,98±0,08	[STD94]

Tabelle 3.1: Triplet-T₁-Quantenausbeuten Φ_{T_1} sowie Singulett-Sauerstoff-Quantenausbeuten Φ_{Δ} der im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendeten Photosensibilisatoren (soweit bekannt). ^a vgl. Abschnitt 5.1, ^b vgl. Abschnitt 10.1.3.

3.7.2 Indirekte Bestimmung von Φ_{Δ}

Leider ist die Triplet-Quantenausbeute Φ_{T_1} nicht für jeden Photosensibilisator bekannt. Deshalb ist in solch einem Fall die direkte Bestimmung von Φ_{Δ} nicht möglich. Eine weitere Möglichkeit zur Bestimmung der Singulett-Sauerstoff-Quantenausbeute eines Photosensibilisators besteht darin, diesen Photosensibilisator mit einem Photosensibilisator mit bekanntem Φ_{Δ} über die Lumineszenz beider zu vergleichen. Dazu

nun folgende theoretischen Überlegungen:

Das Verhältnis der Singulett-Sauerstoff-Quantenausbeuten zweier unterschiedlicher Photosensibilisatoren, für den Fall ohne Rücktransfer $k_{\Delta T_1} = 0$, nach Gleichung (3.42) ist gegeben durch:

$$\frac{\Phi_{\Delta}^{un}([O_2])}{\Phi_{\Delta}^{Ref}([O_2])} = \frac{\Phi_{T_1}^{un} k_{T_1 \Delta}^{un} [O_2]}{K_{T_1}^{un}([O_2])} \cdot \frac{K_{T_1}^{Ref}([O_2])}{\Phi_{T_1}^{Ref} k_{T_1 \Delta}^{Ref} [O_2]} \quad (3.47)$$

Φ_{Δ}^{Ref} ist dabei die Singulett-Sauerstoff-Quantenausbeute des als Referenz verwendeten Photosensibilisators mit bekanntem Φ_{Δ} . Analog hierzu ist Φ_{Δ}^{un} die unbekannte Singulett-Sauerstoff-Quantenausbeute des zweiten Photosensibilisators.

Die Form des Lumineszenzsignals von Singulett-Sauerstoff lässt sich durch die Gleichungen (3.15) und (3.19) beschreiben. Die Energie der Lumineszenz E_L ist proportional zum Integral des Lumineszenzsignals von $t = 0$ bis ∞ . Da das Lumineszenzsignal die Leistung der erzeugten Photonen pro Sekunde beschreibt, ist das Zeitintegral über die Lumineszenz als Energie der Lumineszenz zu verstehen. Dieses Integral lässt sich wie folgt berechnen:

$$E_L([O_2]) = \int_0^{\infty} [^1O_2](t) dt = \frac{[T_1]_0 k_{T_1 \Delta} [O_2]}{K_{\Delta} K_{T_1}([O_2])} \quad (3.48)$$

Berücksichtigt man, dass die Besetzung $[T_1]_0$ des Triplett-Zustandes über die Triplett-Quantenausbeute Φ_{T_1} mit dem angeregten S_1 -Zustand durch die Beziehung $[T_1]_0 = \Phi_{T_1} \cdot [S_1]_0$ verbunden ist, lässt sich das Verhältnis der Lumineszenzenergie zweier unterschiedlicher Photosensibilisatoren wie folgt angeben:

$$\frac{E_L^{un}([O_2])}{E_L^{Ref}([O_2])} = \frac{\Phi_{T_1}^{un} k_{T_1 \Delta}^{un} [O_2]}{K_{T_1}^{un}([O_2])} \cdot \frac{K_{T_1}^{Ref}([O_2])}{\Phi_{T_1}^{Ref} k_{T_1 \Delta}^{Ref} [O_2]} \cdot \frac{[S_1]_0^{un} K_{\Delta}^{Ref}}{[S_1]_0^{Ref} K_{\Delta}^{un}} \quad (3.49)$$

Werden nun beide Photosensibilisatoren unter gleichen Bedingungen untersucht, d.h. beide Photosensibilisatoren befinden sich im gleichen Lösungsmittel, die Farb- und Sauerstoffkonzentration ist in beiden Systemen identisch (vgl. Gleichung (3.18)) und es befindet sich eine geringe Konzentration an Photosensibilisatoren im System um den Einfluss des Eigenquenenchens ($k_{\Delta S_0}[P]$) zu reduzieren, so kann $K_{\Delta}^{Ref} = K_{\Delta}^{un}$ angenommen werden. Weiter gilt, dass die Gesamtbesetzung des $[S_1]_0$ Zustandes zum Zeitpunkt $t = 0$ proportional zur Zahl der absorbierten Photonen n_{abs} ist. n_{abs} hingegen ist proportional zur absorbierten Energie $E_{A,abs}$ des anregenden Laserpulses, $n_{abs} = E_{A,abs}/(h\nu)$, insbesondere da die Anregungswellenlänge ν im Labor immer gleich ist. Somit lässt sich eine Funktion der Lumineszenzenergie E_L gegen

die absorbierte Laserenergie angeben:

$$E_L([O_2], E_{L,abs}) = \frac{\Phi_{T_1} k_{T_1\Delta} [O_2]}{K_{\Delta} K_{T_1} ([O_2])} \cdot E_{A,abs} \quad (3.50)$$

Hierbei ist zu beachten, dass die absorbierte Energie $E_{A,abs}$ ungleich der Energie E_A des anregenden Laserpulses ist (siehe weiter unten). Betrachten wir nun das Verhältnis der Steigung $S([O_2])$ der Lumineszenzenergie gegen die absorbierte Energie $E_{A,abs}$ zweier unterschiedlicher Photosensibilisatoren mit den Überlegungen zu Gleichung (3.49), dann folgt:

$$\frac{S^{un}([O_2])}{S^{Ref}([O_2])} = \frac{\Phi_{T_1}^{un} k_{T_1\Delta}^{un} [O_2]}{K_{T_1}^{un} ([O_2])} \cdot \frac{K_{T_1}^{Ref} ([O_2])}{\Phi_{T_1}^{Ref} k_{T_1\Delta}^{Ref} [O_2]} \quad (3.51)$$

Dies entspricht jedoch genau dem Verhältnis der Singulett-Sauerstoff-Quantenausbeuten zweier unterschiedlicher Photosensibilisatoren (vgl. Gleichung (3.47)). Somit wurde ein Weg gefunden, indirekt, über den Vergleich mit einem bekannten Photosensibilisator mit bekanntem Φ_{Δ} , das Φ_{Δ} eines anderen Photosensibilisators zu finden. Man trägt dabei nur die Energie der Lumineszenz der Photosensibilisatoren gegen die absorbierte Laserleistung auf und beachtet folgenden Zusammenhang:

$$\frac{S^{un}([O_2])}{S^{Ref}([O_2])} = \frac{\Phi_{\Delta}^{un} ([O_2])}{\Phi_{\Delta}^{Ref} ([O_2])} \quad (3.52)$$

Die absorbierte Laserleistung $E_{A,abs}$ lässt sich über das Lambert-Beer'sche Gesetz bestimmen. Dieses Gesetz beschreibt die Intensität des Laserlichtes hinter der Küvette. Es lautet wie folgt:

$$I(d) = I_0 e^{-\sigma N d} \quad (3.53)$$

Dabei ist I_0 die Intensität der Strahlung vor Eintritt in die Lösung und $I(d)$ die Intensität nachdem die Strahlung über die Länge d [m] durch die Lösung unterwegs war. σ [m²] ist der Absorptionswirkungsquerschnitt der Lösung und N [m⁻³] die Anzahl der Teilchen pro Volumeneinheit. Dabei befinden sich bei einer Konzentration von $1 \text{ M} = 1 \text{ mol/l}$ die Anzahl von $6,022 \cdot 10^{23}$ Teilchen in einem Liter. In Abbildung 3.16 ist der typische Verlauf als Funktion der Wechselwirkungslänge d dargestellt. In der Lösung befinden sich $50 \text{ } \mu\text{M}$ ($N = 3,011 \cdot 10^{22} \text{ m}^{-3}$) an Farbstoff. Der Absorptionsquerschnitt bei der Anregungswellenlänge beträgt $\sigma = 3,6 \cdot 10^{-17} \text{ cm}^2$ und die Küvette mit der Lösung ist $d = 1 \text{ cm}$ dick. Die Intensität fällt von normierten 1 auf 0,34 ab. Da die Intensität des Laserstrahls proportional zur Energie ($E = \int_t \int_F I(r,t) dF' dt'$) ist, bedeutet dies, dass 66 % der Laserenergie auf einer Länge von 1 cm absorbiert wurden.

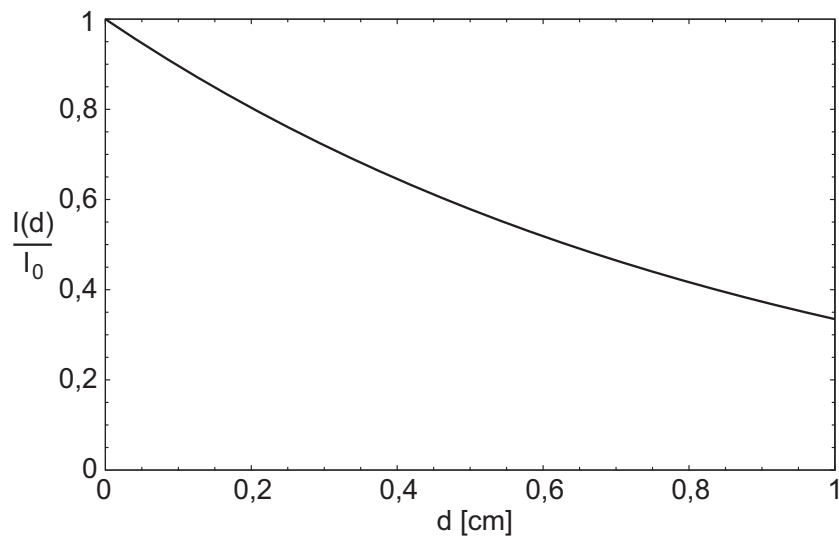


Abbildung 3.16: Verlauf der Strahlintensität durch eine Lösung, beschrieben durch das Lambert-Beer'sche Gesetz (Gleichung (3.53)).

Somit lässt sich nun die absorbierte Laserenergie $E_{A,abs}$ aus der tatsächlichen Energie E_A des anregenden Laserpulses berechnen:

$$E_{A,abs} = \left(1 - \frac{I(d)}{I_0}\right)E_A = (1 - e^{-\sigma Nd})E_A \quad (3.54)$$

Kapitel 4

Experimentelle Methoden

4.1 Versuchsaufbau

In Abbildung 4.1 ist der Versuchsaufbau zur optischen Generierung von Singulett-Sauerstoffschematisch dargestellt. Die optische Anregung des Systems, das sich in einer Küvette (QS-1000, Hellma Optik, Jena, Deutschland) befindet, erfolgt durch einen linear polarisierten, frequenzverdoppelten bzw. frequenzverdreifachten Nd:YAG-Laser (Photon Energy, Ottensoos, Deutschland). Je nach gewünschter Anregungsfrequenz kann einer der beiden Laserstrahlen (355 nm oder 532 nm) abgeblockt werden. Die Pulsdauer des Lasers beträgt 60 ns und die Wiederholrate 2,0 kHz. Abhängig vom Experiment kann eine Pulsenergie im Bereich von 0 bis 100 μJ bei 355 nm bzw. 0 bis 150 μJ bei 532 nm gewählt werden. Bei einem Strahldurchmesser von ca. 5 mm ergibt sich daraus eine maximale Intensität von 8,5 kW/cm^2 bzw. 12,7 kW/cm^2 .

Durch ein Glasplättchen (G) wird ein Reflex auf die zum Triggern der Messkarte verwendete Photodiode gerichtet. Die Single-Photon-Counting-Messkarte (7886S, FAST Com Tec GmbH, Oberhaching, Deutschland) verwendet den Triggerpuls, welcher durch einen Pulsgenerator zeitlich verschoben werden kann, als Startsignal für die Messung. Die beiden Strahlen werden nach dem Glasplättchen jeweils über dielektrische Spiegel (S1 und S2) in Richtung auf die Küvette umgelenkt.

Die Küvette aus Quarzglas SUPRASIL (zwischen 200 nm und 2500 nm wird eine Transmission > 80% garantiert) enthält das zu untersuchende System z.B. Farbstoff in Lösungsmittel. Die Sauerstoffkonzentration in der Küvette kann mit Hilfe der Lumineszenzabklingzeit immobilisierter Luminophoren durch das Sauerstoffmessgerät MICROX TX (PreSens GmbH, Regensburg, Deutschland) bestimmt werden

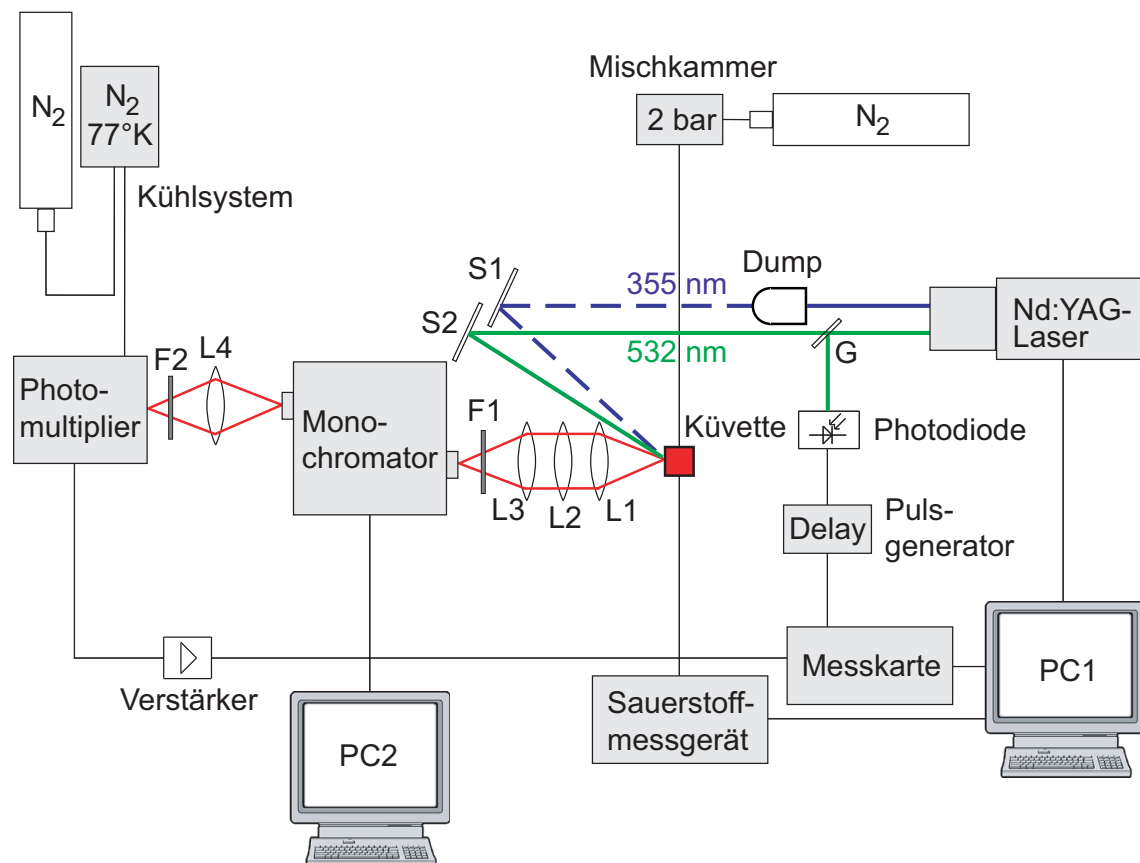


Abbildung 4.1: Versuchsaufbau zur optischen Generierung und Lumineszenzmessung von Singulett-Sauerstoff. S: Spiegel, L: Linse, F: Filter und G: Glasplättchen.

(siehe auch Anhang A). Variiert wird die Sauerstoffkonzentration durch Zugabe von gasförmigem Stickstoff über die Mischkammer, der von unten durch die Lösung hindurch blubbert. Über die Mischkammer können auch andere Gase in die Küvette geführt werden.

Die von der Küvette ausgehende Lumineszenz des Singulett-Sauerstoffs bei 1269 nm oder die Phosphoreszenz von Farbstoffen wird von den Linsen L1, L2 und L3 auf den Eintrittsspalt mit 3 mm Breite des Monochromators (HORIBA, Jobin Yvon Inc., USA) abgebildet. Vor dem Eintrittsspalt befindet sich ein dielektrischer Langpassfilter F1 mit einer Kante bei 1110 nm für die Messungen, welche die Detektion der Lumineszenz des Singulett-Sauerstoff betreffen, bzw. einer Kante bei 610 nm die die Detektion der Phosphoreszenz des Farbstoffs betrifft. Die Durchlasswellenlänge des Monochromators wird über den PC2 gesteuert. Die Breite des Austrittsspalts beträgt ebenfalls 3 mm. Die gesamte spektrale Auflösung des Systems beträgt 9 nm.

Über die Linse L4 wird das Ausgangssignal des Monochromators auf die aktive Fläche (3 x 8 mm) des Photomultipliers (R5509-42, Hamamatsu Photonics Deutsch-

land GmbH, Herrsching) abgebildet. Ein zusätzlicher dielektrischer Filter F2 blockt gezielt die Anregungswellenlänge ab. Der zur Detektion der Singulett-Sauerstoff-Lumineszenz eingesetzte Photomultiplier besitzt eine InP/InGaAsP-Oberfläche, welche beim Einsatz, zur Verminderung des Dunkelrauschens, über das Kühlsystem auf $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gekühlt wird. Nach zwei Stunden Wartezeit bei dieser Temperatur beträgt der Dunkelstrom weniger als 10 nA . Die Quanteneffizienz beträgt 1% bei 1300 nm und die Stromverstärkung $5 \cdot 10^5$ bei einer Kathoden-Anoden-Spannung von 1500 V . Wird ein Photon nachgewiesen, so besitzt das Ausgangssignal bei einer Impedanz von $50\text{ }\Omega$ eine Anstiegszeit von $2,40\text{ ns}$, eine Abklingzeit von $6,36\text{ ns}$ und eine Pulshöhe von $8,5\text{ mV}$. Zur Kühlung wird der kalte Dampf von flüssigem Stickstoff verwendet, der in einer Kühlschlange um die, in einer Kühlkammer befindliche, Photomultiplier-Röhre geführt wird. Durch Anlegen eines Überdrucks von 350 mbar aus einer Stickstoffgas-Flasche, wird der Dampf des flüssigen Stickstoffs aus einer Stickstoffkanne gedrückt. Die Steuerung des Abkühlvorgangs und der Temperatur der Kühlschlange erfolgt durch eine Kontrolleinheit, welche bei Bedarf den Fluss des kalten Stickstoffdampfes durch Schließen eines Ventils unterbricht.

Zur Erfassung des zeitlichen Verlaufs der Singulett-Sauerstoff-Lumineszenz wird das Verfahren des Photonenzählens (single photon counting) verwendet. Dazu wird das vom Photomultiplier kommende elektrische Signal, welches bei der Detektion eines Photons entsteht, zunächst durch einen schnellen Vorverstärker (6954-B-50 Fast Pulse Preamplifier, Philips Scientific, Ramsey, USA) mit einer Anstiegszeit von 200 ps um den Faktor 50 verstärkt, so dass die Schwelle des internen Diskriminators der Vielkanalzählkarte überschritten werden kann. Die Messkarte, welche eine maximale Zeitauflösung von 1 ns besitzt, misst bei Detektion eines Lumineszenzphotons die Zeit zwischen dem Triggersignal (Startsignal), welches von der Photodiode bei einem Laserpuls ausgelöst wird, und dem Multipliersignal. Der Delay des Triggersignals wird dabei so gewählt, dass die Karte mit der Messung dann beginnt, wenn die Anregung des Systems unmittelbar bevorsteht (ca. $1\text{ }\mu\text{s}$ vorher). Die zu beobachtende Zeitspanne nach dem Startsignal kann durch Kanalanzahl \times Kanalbreite über die Wahl dieser beiden Parameter eingestellt werden. Wird ein Photon eine bestimmte Zeit nach dem Startsignal detektiert, so wird der Inhalt des, dieser Zeitspanne entsprechenden, Zählkanals um eins erhöht. Nach Erreichen der Kanalendzahl wird auf das nächste Startsignal gewartet. Dieser Vorgang wird nun in der Regel $1 \cdot 10^4$ bis $8 \cdot 10^4$ mal wiederholt. Die zeitliche statistische Verteilung der so gezählten Photonen wird schließlich zur Weiterverarbeitung in einer ASCII-Datei gespeichert.

Für die direkte Messung des Lumineszenzsignals von Singulett-Sauerstoff ist ein vereinfachter Aufbau sinnvoll. Ohne den Monochromator und die Abbildung nach dem

Monochromator ist eine wesentlich bessere Photonenausbeute möglich. Deshalb wird für die Messungen, die nur das Lumineszenzsignal von Singulett-Sauerstoff betreffen, der in Abbildung 4.2 dargestellte Aufbau benutzt. Die von der Küvette

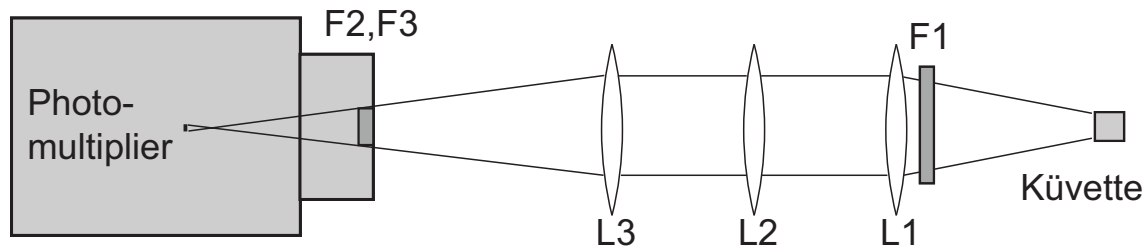


Abbildung 4.2: Vereinfachter Versuchsaufbau zur Lumineszenzmessung von Singulett-Sauerstoff. L: Linse, F: Filter.

ausgehende Lumineszenz des Singulett-Sauerstoffs bei 1269 nm wird von den Linsen L1, L2 und L3 auf die aktive Fläche des Photomultipliers abgebildet, wobei sie vorher noch durch einen dielektrischen Langpassfilter F2 mit einer Kante bei 1110 nm gefiltert wird. Die spektrale Selektion des zu detektierenden Lumineszenzlichtes wird durch zwei Interferenzfilter mit einer Zentralwellenlänge von 1269 nm und Halbwertsbreiten von 25 nm (F1) und 13 nm (F3) erreicht.

4.2 Fluoreszenz- und Durchlichtmikroskopie

Um bei zellulären oder lipiden Strukturen den Ort der Lokalisation des Farbstoffes zu finden, ist es zweckmäßig, ein Fluoreszenzmikroskop einzusetzen. Dabei wird der Farbstoff durch Licht angeregt und die dabei entstehende Fluoreszenz räumlich aufgenommen. Durchlichtaufnahmen dienen der Erkennung der Form des zu untersuchenden Objekts. Als Fluoreszenz- bzw. Durchlichtmikroskop wurde ein Zeiss Axiotech Mikroskop (Zeiss, Jena, Deutschland) verwendet, welches in Abbildung 4.3 schematisch für beide Betriebsformen dargestellt ist (optische Auflösung 1 μm). Als Lichtquellen standen für die Fluoreszenzaufnahmen (Abbildung 4.3 (a)) eine Quecksilberdampfhochdrucklampe (HBO) zur Verfügung. Im Strahlengang der HBO-Lampe befand sich ein Neutralglasfilter NG-4 (F1). Mit Hilfe der Blende (B) ist es möglich, den ausgeleuchteten Bildausschnitt zu verkleinern. Die Blende war jedoch bei allen Aufnahmen ganz geöffnet. In den folgenden Filterblock (F2) waren die zu den Organellfarbstoffen (Farbstoffe, die Bestandteile der Zelle sichtbar machen) und zu Photofrin bzw. ATMPn passenden Anregungsfilter eingebaut. Der Anre-

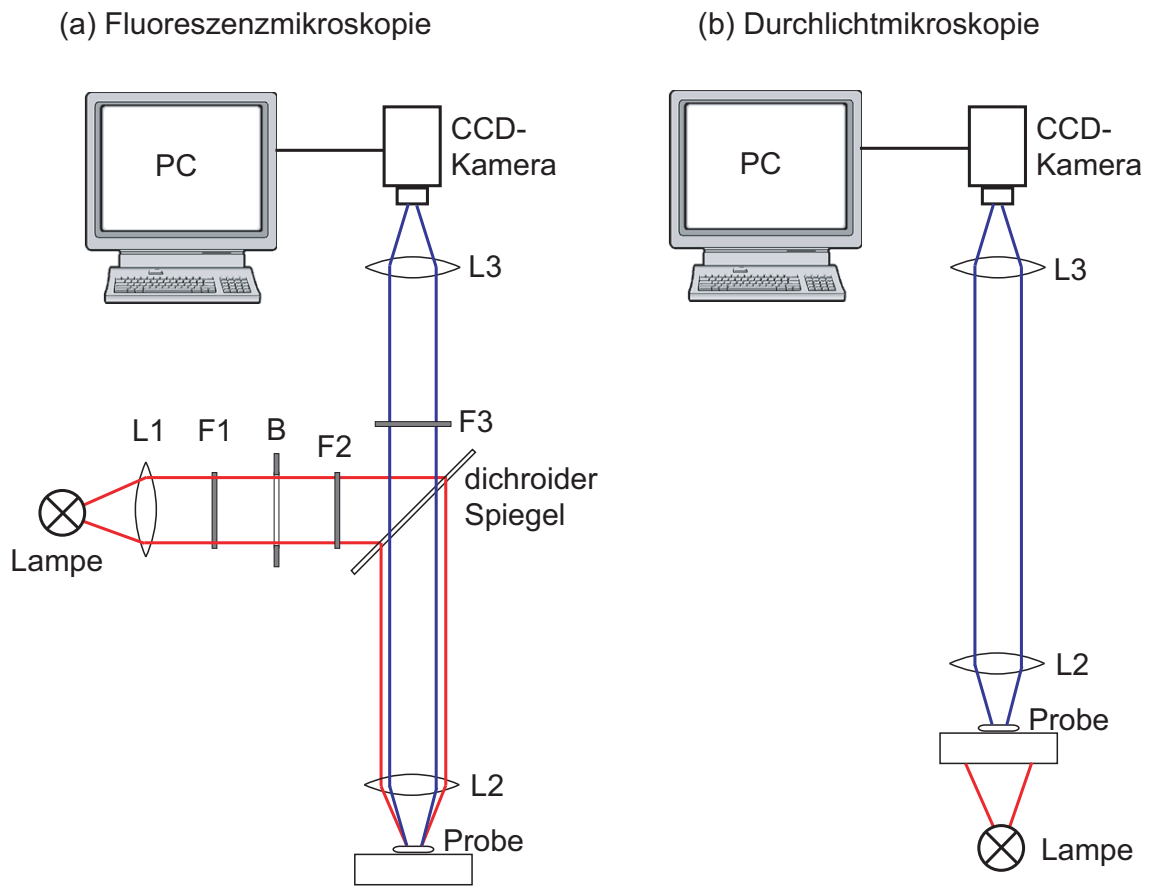


Abbildung 4.3: Schematische Darstellung des Strahlengangs im (a) Fluoreszenzmikroskop und im (b) Durchlichtmikroskop.

gungsfILTER besitzt seine höchste Transmission im Absorptionsbereich des Farbstoffs und ist sonst nicht transmittierend. Der dichroide Strahlteilerspiegel reflektiert das gefilterte Anregungslicht auf die Probe. Das von dort ausgehende Fluoreszenzlicht wird vom Strahlteilerspiegel nicht reflektiert und durch den Emissionsfilter (F3) von Resten des Anregungslichts und allem anderen, nicht zur Fluoreszenz des jeweiligen Farbstoffes gehörigem, Licht spektral getrennt. Die so entstandenen Fluoreszenzbilder jedes Farbstoffes wurden von einer CCD-Kamera (PCO, Kelheim) aufgenommen und per Bildverarbeitung zusammengefügt.

Tabelle 4.1 gibt eine Liste der verwendeten Anregungs- und Emissionsfilter (Omega Optical, Brattleboro, USA) sowie der dichroiden Spiegel (Omega Optical) wieder. Die jeweilige Filterbezeichnung enthält die Zentralwellenlänge sowie die Halbwertsbreite (z.B. hat der Filter 695AF55 eine Zentralwellenlänge von 695 nm und eine Halbwertsbreite von 55 nm). Die Klammerwerte geben die Katalogbezeichnung des deutschen Vertriebs durch die Firma Photomed GmbH, Seefeld an. Die Farbstoffe Hoechst 33342, Rhodamin 6G und LysoTrackerGreen sind Organellfarbstoffe die

Farbstoff	Anregungsfilter	dichroider Spiegel	Emissionsfilter
Photofrin	405DF40 (XF1008)	415DRLP (XF2059)	695AF55 (XF3076)
ATMPn	400AF30 (XF1076)	430DCLP (XF2002)	635DF55 (XF3015)
Hoechst 33342	365WB50 (XF1005)	400DCLP (XF2001)	450AF58 (XF3073)
Rhodamin 6G	475AF40 (XF1073)	505DRLP (XF2010)	545AF35 (XF3074)
LysoTrackerGreen	475AF40 (XF1073)	505DRLP (XF2010)	545AF35 (XF3074)

Tabelle 4.1: Liste der für die Kollokalisationsaufnahmen verwendeten Anregungs- und Emissionsfilter sowie der dichroiden Spiegel.

sich bei Zellen im Zellkern, Mitochondrien und Lysosomen anlagern (vgl. Abschnitt 7.2).

Für die Durchlichtaufnahmen (Abbildung 4.3 (b)) wurde die Probe von unten mit einer Halogenlampe durchstrahlt. Das Licht, ausgehend von der Probe, wurde mit den Linsen L2 und L3 auf die CCD-Kamera abgebildet und mit dem PC ausgewertet.

4.3 Motivation dieser Arbeit

Zur Detektion des Singulett-Sauerstoffs ist der direkte Nachweis über dessen Lumineszenz bei 1269 nm den indirekten Methoden vorzuziehen, da bei letzteren zusätzliche Substanzen, die chemisch durch Singulett-Sauerstoff auf eine definierte Weise verändert werden, involviert sind (vgl. Abschnitt 3.4). Eine wesentliche Schwierigkeit bei der Spektroskopie der Singulett-Sauerstoff-Lumineszenz bestand bisher jedoch in der geringen Empfindlichkeit der verwendeten Detektoren (Standard-Photomultiplier, Germaniumdetektoren). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wird ein neuartiger Photomultiplier mit einer hohen Sensitivität und hervorragendem Signal-Rausch-Verhältnis eingesetzt, wobei in Verbindung mit einer schnellen Zähl-einrichtung ebenfalls eine hohe Zeitauflösung erreicht wird. Dadurch kann der Nachweis von Singulett-Sauerstoff über dessen Lumineszenz entscheidend verbessert werden, so dass u.a. die erstmalige Detektion der Singulett-Sauerstoff-Lumineszenz bei verschiedenen komplexen Systemen durchgeführt werden kann.

In den ersten, experimentellen Kapiteln betrachten wir die Erzeugung und Detektion von Singulett-Sauerstoff in steigend komplexer werdender Umgebung. Generiert wird der molekulare Singulett-Sauerstoff durch Energietransfer von exogenen Pho-

tosensibilisatoren, welche mit einer Wellenlänge von 532 nm angeregt werden. Als erstes System betrachten wir Farbstoffe in Lösungen (Kapitel 5), dann in Lipid bzw. Lipidsuspensionen (Kapitel 6) und zum Schluss im lebenden Organismus wie einer Zelle (Kapitel 7) oder einem Bakterium (Kapitel 8). Das Ziel dieser Kapitel ist nicht nur der direkte Nachweis von Singulett-Sauerstoff, insbesondere in Zellen, sondern auch die Lokalisation des Entstehungsortes von Singulett-Sauerstoff. Die wesentlichen Ergebnisse wurden analog zu diesem Kapitel von Baier *et al.* [BME05] und Maisch *et al.* [MFB05] veröffentlicht.

Im experimentellen Kapitel 10 wird die Erzeugung und Detektion von Singulett-Sauerstoff ohne die Verwendung von zusätzlichen exogenen Photosensibilisatoren untersucht. Es werden nur Stoffe verwendet und untersucht, die auch in lebenden Zellen vorkommen. Es soll nachgewiesen werden, dass durch UVA-Licht (355 nm) Singulett-Sauerstoff in Zellen generiert werden kann. Die Ergebnisse dieses Kapitels wurden von Baier *et al.* [BMM05] veröffentlicht.

Kapitel 5

Singulett-Sauerstoff in Lösungen

Das einfachste zu untersuchende System ist ein Photosensibilisator der sich in Lösung befindet. Dieser wird durch Laserpulse bei 532 nm angeregt und gibt danach seine Energie wieder ab und regt so Sauerstoff zu Singulett-Sauerstoff an. Dieser befindet sich dann im Farbstoff-Lösungsmittel-System und zerfällt strahlungslos oder unter Aussendung eines Lumineszenzphotons zurück in den Grundzustand.

Neben den Farbstofflösungen wurden Proben ohne Farbstoff hergestellt und untersucht. Es sollte ausgeschlossen werden, dass andere Substanzen außer dem Photosensibilisator Singulett-Sauerstoff generieren. Im Fall der Farbstofflösungen wurde also auch das reine Lösungsmittel untersucht. In keinem Fall konnte ein Lumineszenzsignal allein durch das Lösungsmittel gefunden werden.

5.1 Verwendete Photosensibilisatoren

Im Folgenden seien nun die für 532 nm verwendeten Photosensibilisatoren beschrieben. Als Photosensibilisatoren wurden Photofrin, welches klinisch zugelassen [DGH98], aber keine Reinsubstanz ist, und ATMPn, welches nicht klinisch zugelassen ist, aber eine Reinsubstanz darstellt, verwendet. Ein weiterer Vorteil von ATMPn besteht darin, dass es nicht wasserlöslich ist, wohingegen Photofrin sich in Wasser sehr gut löst und in Ethanol teilweise. Dies ist deshalb von Vorteil, weil bei den Lipid- und Zellexperimenten Wasser als Lösungsmittel verwendet wird und es dort besser ist, wenn sich der Photosensibilisator nur im Lipid oder nur in der Zelle löst. Als Lösungsmittel wurden Wasser (H_2O), schweres Wasser (Deuteriumoxid, D_2O), Ethanol ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$, EtOH) und deuteriertes Ethanol ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OD}$, EtOD) verwendet.

Durch die Verwendung von deuterierten Lösungsmitteln wird eine größere Abklingdauer, d. h. nach $\tau_{\Delta} = 1/k_{\Delta}$ eine geringere Abklingrate des Singulett-Sauerstoffs und damit, nach Gleichungen (3.15), auch eine höhere Lumineszenzintensität erreicht. Die gezeigten Spektren der Absorptionsquerschnitte der Photosensibilisatoren wurden aus Transmissionsspektren, aufgenommen mit einem Einstrahl-Spektrophotometer (DU-640, Beckman Instruments, München), berechnet.

5.1.1 Photofrin

Photofrin ist ein, für die klinische PDT von Tumoren der Speiseröhre, der Blase sowie der Lunge, zugelassenes Medikament [DGH98]. Dabei handelt es sich um ein Oligomeregemisch aus bis zu acht Porphyrinringen, die über Ester- und vor allem Etherbrücken miteinander verbunden sind [STT99]. Abbildung 5.1 zeigt die Strukturformel von Photofrin [S98]. Diese sog. Porphyrine wiederum sind zyklische

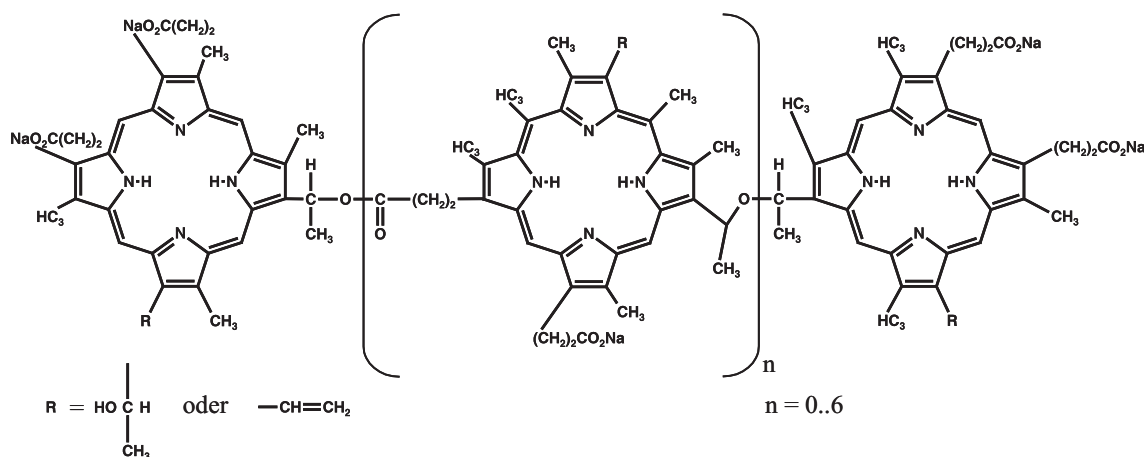


Abbildung 5.1: Strukturformel von Photofrin [S98].

Tetra-Pyrrole, bei denen die Pyrrolringe über Methinbrücken verbunden sind. Die so gebildeten Ringmoleküle sind aromatisch und sehr stabil. Porphyrine unterscheiden sich lediglich durch ihre verschiedenen Seitenketten. Der Gehalt an monomeren Porphyrinen wie z.B. Hämatoporphyrin und Protoporphyrin kann bei Photofrin bis zu 30 % betragen [QQG89]. Desweiteren beträgt die durchschnittliche Oligomeregröße $2,7 \pm 0,1$ Porphyrineinheiten [STT99], was einer durchschnittlichen Molmasse von $m_M = (1600 \pm 100)$ g/mol entspricht. Photofrin löst sich sehr gut in Wasser und eher schlecht in Ethanol. Für Photofrin wurde nachgewiesen, dass es bei der PDT durch die Produktion von Singulett-Sauerstoff wirksam ist und nicht durch die Erzeugung von Radikalen [K84, PT86]. Somit ist Photofrin ein Typ-II-Photosensibilisator.

Da es sich bei Photofrin um ein Oligomerengemisch verschiedener Porphyrine handelt und somit keine exakten Teilchenzahldichten berechnet werden können, zeigt abschließend Abbildung 5.2 den Absorptionsquerschnitt von Photofrin in D₂O in Abhängigkeit von der Wellenlänge, welcher mit der oben genannten durchschnittlichen Molmasse berechnet wurde. Zu erkennen ist eine ausgeprägte UV-Bande

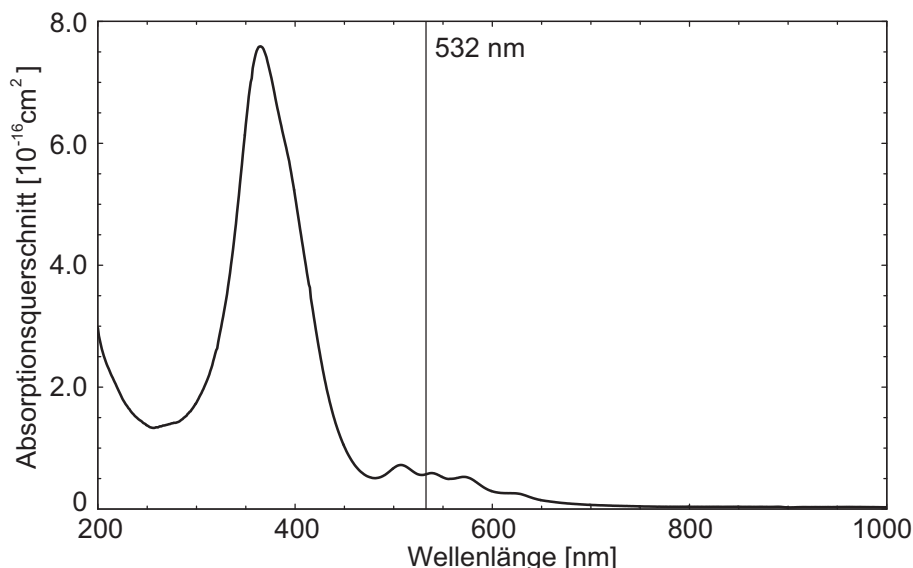


Abbildung 5.2: Absorptionsquerschnitt von Photofrin in D₂O in Abhängigkeit von der Wellenlänge. Die untersuchte Lösung hatte eine Konzentration von 2 μ M Photofrin.

sowie eine schwächere Absorption im sichtbaren Spektralbereich. Der Absorptionsquerschnitt von Photofrin bei der verwendeten Anregungswellenlänge von 532 nm beträgt $(5,7 \pm 0,6) \cdot 10^{-17} \text{ cm}^2$.

5.1.2 9-acetoxy-2,7,12,17-tetrakis-(β -methoxyethyl)-Porphycen (ATMPn)

Bei 9-acetoxy-2,7,12,17-tetrakis-(β -methoxyethyl)-Porphycen (ATMPn) handelt es sich um ein Strukturisomer von Porphin, der Stammverbindung aller Porphyrine. Abbildung 5.3 zeigt die chemische Struktur von ATMPn. Das ATMPn ist ein Typ-II-Photosensibilisator [BMM97] und wurde bereits sowohl in vitro [SKA96] als auch in vivo [ASS97] getestet. Es handelt sich aber nicht um ein zugelassenes Medikament. Die molare Masse von ATMPn beträgt $m_M = 601 \text{ g/mol}$ (bestimmt vom Institut für anorganische Chemie, Universität Köln). ATMPn löst sich sehr gut in Ethanol, jedoch nicht in Wasser.

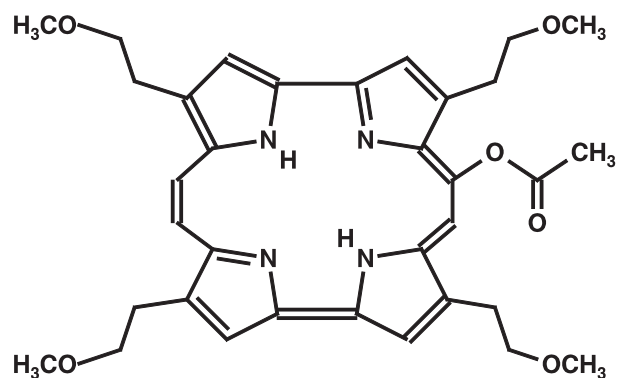


Abbildung 5.3: Strukturformel von ATMPn [BMM97].

Abbildung 5.4 zeigt den Absorptionsquerschnitt von ATMPn in EtOD in Abhängigkeit von der Wellenlänge. Zu erkennen ist eine ausgeprägte Absorptionsbande im

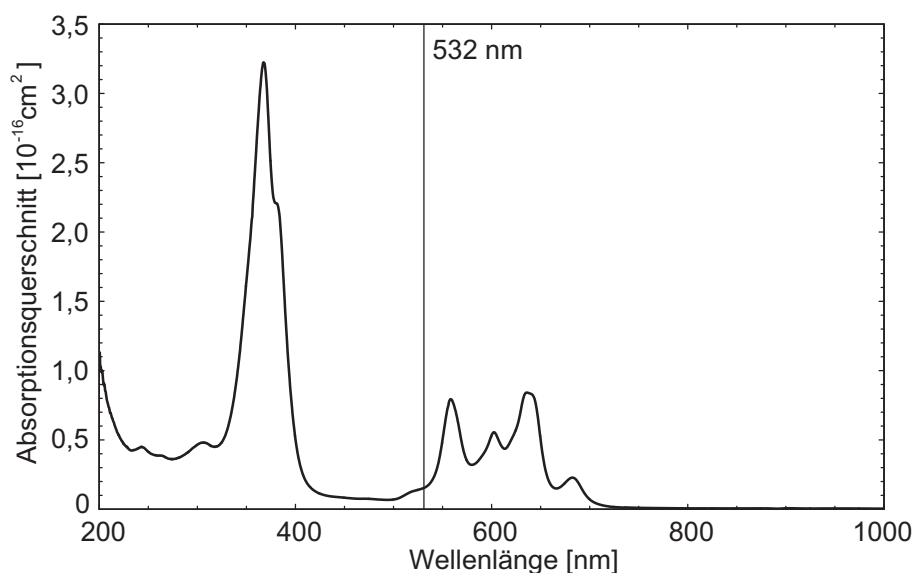


Abbildung 5.4: Absorptionsquerschnitt von ATMPn in EtOD in Abhängigkeit von der Wellenlänge. Die untersuchte Lösung hatte eine Konzentration von 10 μM .

UV, desweiteren die Absorption im grünen und roten Spektralbereich. Der Absorptionsquerschnitt von ATMPn bei der verwendeten Anregungswellenlänge von 532 nm beträgt $(1,6 \pm 0,2) \cdot 10^{-17} \text{ cm}^2$.

5.1.3 Tetraazaporphyrin

Tetraazaporphyrin gehört zur Familie der Porphyrine. Abbildung 5.5 zeigt die Strukturformel von Tetraazaporphyrin [BCG95]. Der erste Triplett-Zustand T_1 dieses Por-

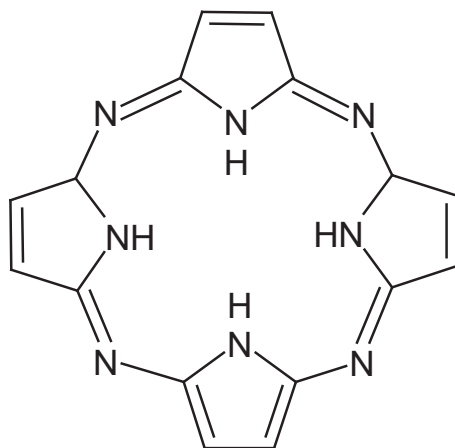


Abbildung 5.5: Strukturformel von Tetraazaporphyrin [BCG95].

phyrins liegt bei etwa 1,05 eV [BCG95] und somit energetisch in der Nähe vom Singulett-Zustand des molekularen Sauerstoffs (0,98 eV). Aufgrund dieser Tatsache sollte der energetische Rücktransfer vom Singulett-Sauerstoff zum Triplett des Photosensibilisators wahrscheinlich und die Rücktransferrate $k_{\Delta T_1}$ größer als Null sein (vgl. Abbildung 3.7). Tetraazaporphyrin eignet sich deshalb zur Untersuchung des Rücktransfers.

Die molare Masse von Tetraazaporphyrin beträgt $m_M = 318,3$ g/mol. Es löst sich gut in Ethanol, jedoch nicht in Wasser.

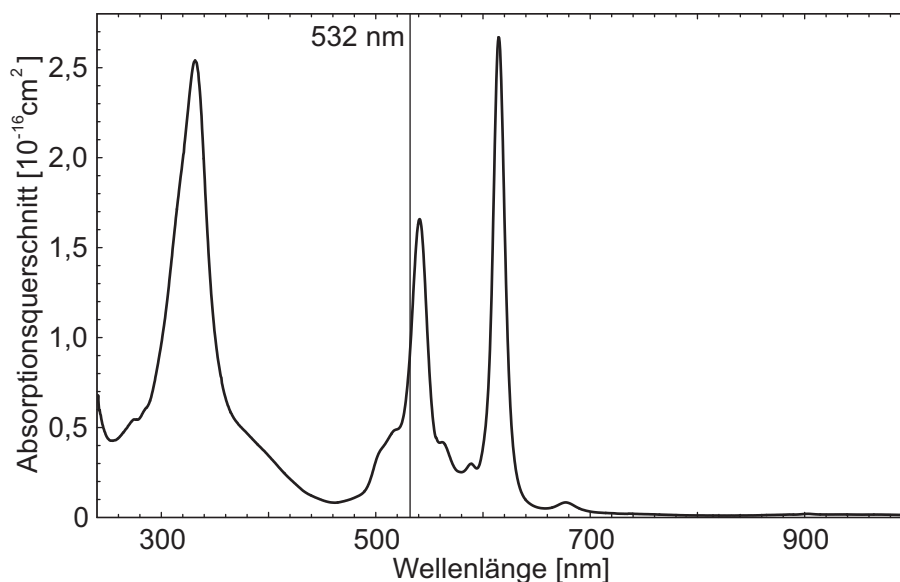


Abbildung 5.6: Absorptionsquerschnitt von Tetraazaporphyrin in EtOD in Abhängigkeit von der Wellenlänge. Die untersuchte Lösung hatte eine Konzentration von 10 μ M.

Abbildung 5.6 zeigt den Absorptionsquerschnitt von Tetraazaporphyrin in EtOD

in Abhängigkeit von der Wellenlänge. Zu erkennen ist eine ausgeprägte Absorptionsbande von 500 nm bis 570 nm und von 600 nm bis 630 nm. Des weiteren eine Absorption im UV für kleiner 400 nm. Der Absorptionsquerschnitt von ATMPn bei der verwendeten Anregungswellenlänge von 532 nm beträgt $(9,3 \pm 0,9) \cdot 10^{-17} \text{ cm}^2$.

5.2 Singulett-Sauerstoff in reiner Lösung

Zur Präparation der Lösungen von ATMPn bzw. Photofrin wurde die für eine Photosensibilisator-Konzentration von 100 μM bzw. 100 $\mu\text{g/ml}$ notwendige Stoffmenge mit Hilfe einer Analysewaage (Mettler) abgewogen und die dazugehörige Menge an benötigten Lösungsmitteln mit Hilfe eines Mikropipettierers zugegeben. Um ein vollständiges Auflösen des Farbstoffs im Lösungsmittel zu erreichen, wurden die Lösungen für eine Zeitdauer von 10 Minuten in ein Ultraschallbad (Bandelin) gestellt. Diese Lösung wurde als Stammlösung zur Probenpräparation weiterverwendet. Dünnere Lösungen wurden über eine Verdünnungsreihe erzeugt.

In Abbildung 5.7 sind exemplarische Einzelmessungen der Singulett-Sauerstoff-Lumineszenz, generiert durch photoaktiviertes Photofrin, dargestellt. Die Anregung durch den Laserpuls geschieht bei 0 μs und die zeitliche Länge des Pulses ist durch zwei Linien dargestellt. Die Anregungsleistung betrug 100 mW bei einer Wiederholrate von 2,0 kHz. Es wurden jeweils $4 \cdot 10^4$ Durchgänge addiert.

In Abbildung 5.7 (a) wurden 50 $\mu\text{g/ml}$ Photofrin in H_2O gelöst. Die Messung wurde bei Luftsättigung durchgeführt, was einer Konzentration von 270 μM Sauerstoff im Lösungsmittel H_2O entspricht (vgl. Anhang A). Der Singulett-Sauerstoff, der sich im System Photofrin- H_2O befindet, zeigt ein Lumineszenzsignal das exponentiell ansteigt bzw. exponentiell wieder abfällt. Aufgrund der logarithmischen Auftragung ist ein lineares Abfallen zu sehen. Mit Hilfe von Gleichung (3.15) (durchgezogene Linie) lassen sich nun die Anstiegs- und Abklingrate, β_1 und β_2 , bzw. die Anstiegs- und Abklingzeit, welche dem Kehrwert der Raten entsprechen, bestimmen. Die Bestimmung erfolgte unter Verwendung der Levenberg-Marquardt-Methode mit Mathematica 4.2. Die absolute Abweichung der einzelnen Messpunkte vom Fit ist in Abbildung 5.7 (a) unten dargestellt. Diese Darstellung gibt Auskunft über die Qualität des Fits. Schwankt der Betrag der Abweichung statistisch um den Fit ist ein guter Fit ermittelt worden. Die Anstiegszeit, welche der Lebensdauer des T_1 -Zustand des Farbstoffes entspricht, beträgt hier $\tau_1 = (2,7 \pm 0,7) \mu\text{s}$. Aufgrund der wenigen Messpunkte, die zur Bestimmung der Anstiegszeit zu Verfügung stehen, ist diese Zeit mit größter Vorsicht zu betrachten. Die Abklingzeit, welche der Lebensdauer vom

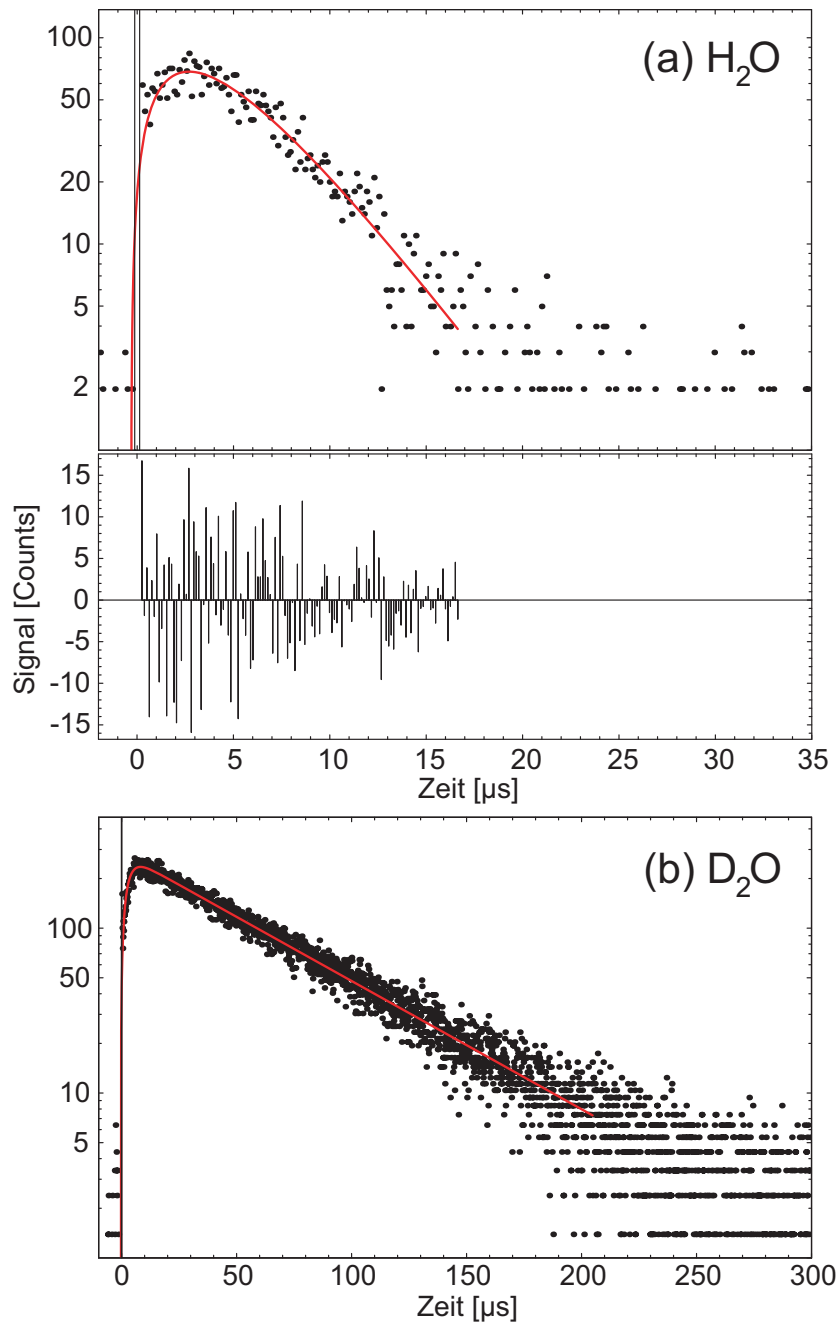


Abbildung 5.7: Singulett-Sauerstoff Lumineszenzsignal generiert durch 50 $\mu\text{g/ml}$ Photofrin gelöst in (a) H_2O und (b) D_2O .

Singulett-Sauerstoff in diesem System entspricht, kann zu $\tau_2 = (3,5 \pm 0,5) \mu\text{s}$ bestimmt werden. Vergleiche mit der Literatur ([WHR95] 3,1 μs bis 4,2 μs) zeigen eine gute Übereinstimmung mit diesem Wert.

Wiederum wurden in Abbildung 5.7 (b) 50 $\mu\text{g/ml}$ Photofrin gelöst. Als Lösungsmittel wurde hier jedoch deuteriertes Wasser (D_2O) gewählt. Auch dieses System wurde bei Luftsättigung (entspricht 240 μM in D_2O , vgl. Anhang A) untersucht. Die

Anstiegszeit beträgt wie vorher $\tau_1 = (2,7 \pm 0,7) \mu\text{s}$. Die Lebensdauer von Singulett-Sauerstoff im System Photofrin- D_2O beträgt hier $\tau_2 = (57 \pm 8) \mu\text{s}$. In der Literatur sind vergleichbare Werte ([WHR95] $44 \mu\text{s}$ bis $70 \mu\text{s}$) zu finden.

5.3 Nachweismethoden für Singulett-Sauerstoff

Um auszuschließen, dass das detektierte Signal Phosphoreszenz des Photosensibilisators ist und somit das Signal irrtümlich dem Lumineszenzsignal des Singulett-Sauerstoffs zugeordnet wird, gibt es drei wesentliche Nachweismethoden zur Überprüfung.

5.3.1 Lumineszenzspektrum von Singulett-Sauerstoff

Mit Hilfe eines Monochromators ist es möglich, ein Wellenlängenspektrum aufzunehmen und somit die Lumineszenz des Singulett-Sauerstoff bei $\lambda = 1269 \text{ nm}$ als Ausprägung bei luftgesättigten System sichtbar zu machen. Als Gegenbeweis sollte die Ausprägung bei $\lambda = 1269 \text{ nm}$ verschwinden, wenn der Sauerstoff aus dem System entfernt wird. In Abbildung 5.8 ist das Lumineszenzspektrum von Singulett-

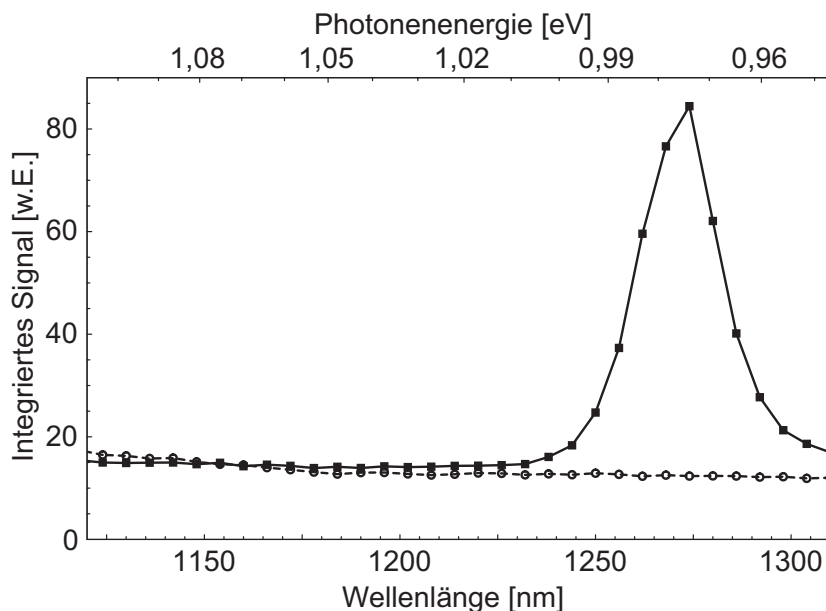


Abbildung 5.8: Lumineszenzspektrum von Singulett-Sauerstoff, generiert durch $0,1 \text{ mM}$ ATMPn in EtOD. Durchgezogene Linie für luftgesättigte Lösung und gepunktete Linie für Lösung ohne Sauerstoff. Die Rechtecke und Kreise entsprechen einzelnen Messungen.

Sauerstoff für beide Fälle aufgetragen. Als Lösung wurde 0,1 mM ATMPn in EtOD verwendet. Die einzelnen Messungen (dargestellt als Rechtecke und Kreise) wurden zeitaufgelöst aufgenommen. Die einzelnen Signale wurden dann numerisch integriert und das Integral gegen die Wellenlänge bzw. Photonenenergie aufgetragen. Das Wellenlängenspektrum der luftgesättigten Lösung (durchgezogene Linie mit Rechtecken) zeigt eine Ausprägung bei $\lambda = 1269$ nm, die der Lumineszenz von Singulett-Sauerstoff zugeordnet werden kann. Die Lösung ohne Sauerstoff (gepunktete Linie mit Kreisen) zeigt diese Ausprägung nicht. Diese Lösung wurde mit dem sog. Freeze-Pump-Thaw-Zyklus (siehe Anhang C) erstellt, um den Sauerstoff so weit wie möglich zu entfernen. Starkes Blubbern mit Stickstoff genügt für diese Messung nicht. Beim Blubbern bleibt immer eine geringe Sauerstoff-Konzentration im Promille-Bereich übrig, die immer noch über die Lumineszenz von Singulett-Sauerstoff nachgewiesen werden kann.

5.3.2 Lebensdauer von Singulett-Sauerstoff in Lösung

Als weiterer Nachweis für Singulett-Sauerstoff kann die Lebensdauer von Singulett-Sauerstoff in Lösung betrachtet werden. Je nach Lösungsmittel leben die Singulett-Sauerstoff-Moleküle unterschiedlich lange. In Tabelle 5.1 sind die typischen Lebensdauern von Singulett-Sauerstoff in unterschiedlichen Lösungsmitteln aufgelistet. In der zweiten Spalte sind die in dieser Arbeit gemessenen Werte dargestellt.

Lösungsmittel	Lebensdauer von Singulett-Sauerstoff [μ s]		
	gemessen	korrigiert	Literatur
H ₂ O	3,5 \pm 0,5 ^a	3,5 \pm 0,5 ^a	3,1 - 4,2 [WHR95] 3,5 \pm 0,5 [BME05]
D ₂ O	57 \pm 8 ^a	64 \pm 8 ^a	44 - 70 [WHR95] 67 \pm 3 μ s [EKM02]
EtOH	14 \pm 2 ^b	15 \pm 2 ^b	10 - 16 [WHR95]
EtOD	31 \pm 4 ^b	35 \pm 4 ^b	29 - 31 [WHR95] 31 \pm 2 [BME02]

Tabelle 5.1: Die Lebensdauer von Singulett-Sauerstoff in unterschiedlichen Lösungsmitteln.

^a 50 μ g/ml Photofrin. ^b 50 μ M ATMPn.

Berücksichtigt man, dass die Lebensdauer von Singulett-Sauerstoff durch die Anwe-

senheit von Photosensibilisatoren gequenchet wird, lässt sich die korrigierte Lebensdauer (dritte Spalte) über Gleichung (3.11) berechnen. Für Photofrin wurden die Raten aus der Diplomarbeit von Wiesmann [W04] verwendet ($k_{\Delta S_0} = 2,8 \cdot 10^{-5} \mu s^{-1} \text{ ml}/\mu g$ und $k_{\Delta T_1} = 1,0 \cdot 10^{-5} \mu s^{-1} \text{ ml}/\mu g$). Für ATMPn wurden die Raten aus dem Paper von Baumer *et al.* [BME02] verwendet ($k_{\Delta S_0} = 7 \cdot 10^{-5} \mu s^{-1} \mu M^{-1}$ und $k_{\Delta T_1} = 0$). Es zeigt sich eine gute Übereinstimmung zwischen den gemessenen und den Literaturwerten.

5.3.3 Natriumazid als Quencher

Eine weitere Nachweismöglichkeit ist das Verkürzen der Singulett-Sauerstoff-Lebensdauer durch Quencher wie Natriumazid. Abbildung 5.9 zeigt das Lumines-

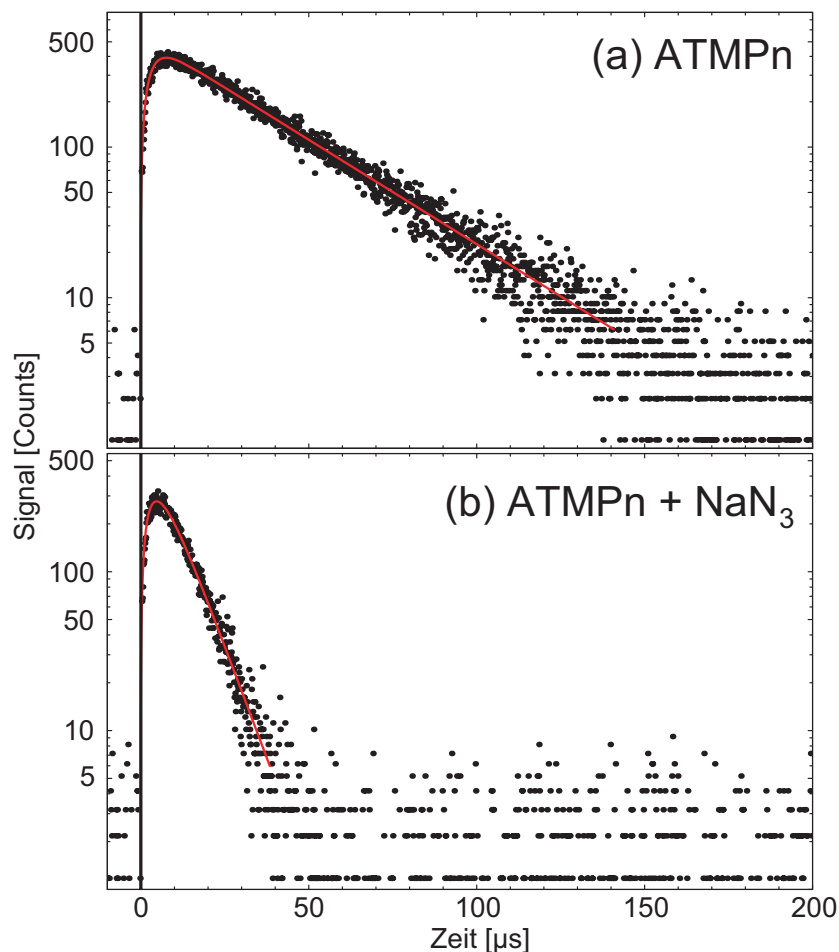


Abbildung 5.9: Singulett-Sauerstoff-Lumineszenzsignal generiert durch 0,1 mM ATMPn gelöst in (a) EtOD und (b) EtOD mit 0,5 mM Natriumazid mit jeweils 0,185 mM Sauerstoff (= 10 % Luftsättigung).

zenzsignal von Singulett-Sauerstoff generiert durch 0,1 mM ATMPn gelöst in EtOD

bei 0,185 mM (10 % Luftsättigung) Sauerstoffkonzentration. In Abbildung 5.9 (a) ohne Natriumazid ist die typische Lebensdauer [BME02] von Singulett-Sauerstoff in deuteriertem Ethanol zu sehen, hier $\tau_2 = (31 \pm 4) \mu\text{s}$. Bei Zugabe von 500 μM Natriumazid (Abbildung 5.9 (b)) verkürzt sich die Lebensdauer von Singulett-Sauerstoff auf $\tau_2 = (7,7 \pm 1,1) \mu\text{s}$. Zusätzlich tritt eine Verringerung der Signalhöhe nach Gleichung (3.15) ein. Die Anstiegszeit bleibt in beiden Fällen mit $\tau_1 = (3,1 \pm 0,8) \mu\text{s}$ etwa konstant. Dies zeigt eine weitere wichtige Eigenschaft von Natriumazid. Es quencht den Singulett-Zustand von Sauerstoff (Quencherratenkonstante für Singulett-Zustand: $k_{\Delta Q} = (2,1 \pm 0,3) \cdot 10^8 \text{ s}^{-1} \text{M}^{-1}$ [BME02]) d.h. τ_2 wird verkürzt. Hingegen wird der Triplett-Zustand des Photosensibilisators nur sehr schwach gequencht (Quencherratenkonstante für Triplett-Zustand: $k_{T_1Q} = (2,0 \pm 0,4) \cdot 10^7 \text{ s}^{-1} \text{M}^{-1}$ [BME02]), τ_1 bleibt annähernd gleich.

5.4 Tetraazaporphyrin in Lösung

Hier werden die Messergebnisse präsentiert, die bei der Messung der Singulett-Sauerstoff-Lumineszenz in EtOD generiert durch Tetraazaporphyrin gewonnen wurden. Um die Raten und Ratenkonstanten für diese Farbstoff-Lösungsmittel-Kombination zu erhalten, wurden Sauerstoff-, Farbstoff- und Quencherkonzentration variiert. Es wurde versucht, die erhaltenen Werte für die Anstiegs- und Abfallraten im jeweiligen Kontext mit den theoretisch erwarteten Verläufen (Abschnitt 3.6) in Einklang zu bringen.

Jede Einzelmessung umfasst $4 \cdot 10^4$ Laserpulse, die Kanalbreite der Messkarte beträgt 16 ns. In der nachfolgenden Auswertung wurden acht solcher Kanäle zusammengefasst, um die Auswertung zu erleichtern. In den Abbildungen 5.10 bis 5.12 sind die Anstiegsraten als Quadrate und die Abfallraten als Kreise eingezeichnet. Wegen der besseren Übersichtlichkeit wurde auf Fehlerbalken verzichtet. Bei der Anstiegsrate ist ein Fehler von 25 % und bei der Abfallrate ein Fehler von 15 % anzunehmen. Die analytisch erwarteten Verläufe für β_1 und β_2 mit den ermittelten Raten und Ratenkonstanten sind im Fall der Energierückkopplung vom Singulett-Sauerstoff-Zustand auf den Triplett-Zustand des Farbstoffes als durchgezogene Linien und ohne diese Rückkopplung als gestrichelte Linien eingezeichnet.

5.4.1 Sauerstoffvariation

Die Variation der Sauerstoffkonzentration $[O_2]$ in EtOD wurde bei einer Tetraazaporphyrin-Konzentration von $[P] = 4,71 \mu\text{M}$ und ohne Zugabe eines Quenchers durchgeführt. Zur Bestimmung der Sauerstoffkonzentration wird davon ausgegangen, dass bei Luftsättigung 1,85 mM Sauerstoff in EtOD gelöst sind (vgl. Anhang A). Eine Verringerung der Sauerstoffkonzentration erfolgte durch Blubbern der Farbstofflösung mit reinem Stickstoff in einer Durchflussküvette. Dadurch wird der Sauerstoffpartialdruck abgesenkt, und es stellt sich eine niedrigere Sauerstoffkonzentration in der Lösung ein.

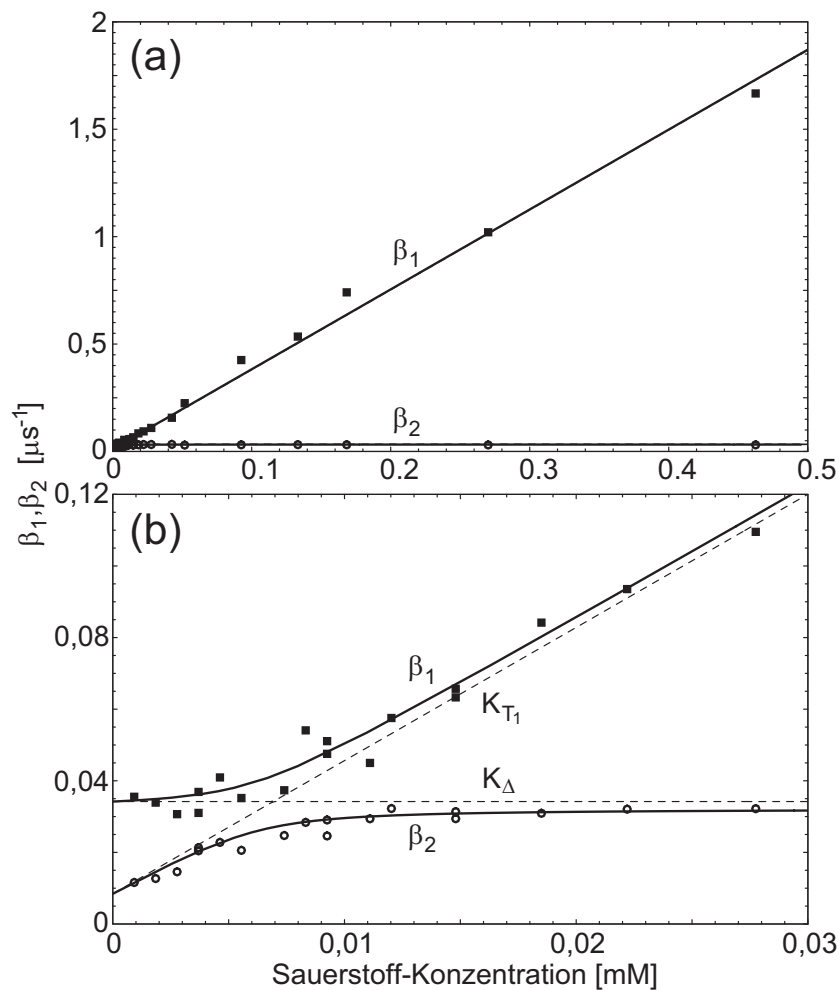


Abbildung 5.10: Verlauf der Raten β_1 und β_2 (durchgezogene Linie) in Abhängigkeit von der Sauerstoff-Konzentration. Singulett-Sauerstoff wurde generiert durch $4,71 \mu\text{M}$ Tetraazaporphyrin in EtOD. Bei der Anstiegsrate ist ein Fehler von 25 % und bei der Abfallrate ein Fehler von 15 % anzunehmen.

In Abbildung 5.10 ist der Verlauf der Raten β_1 und β_2 (durchgezogene Linien) in

Abhängigkeit von der Sauerstoff-Konzentration aufgetragen. In (a) ist der gesamte Verlauf und in (b) der Verlauf für kleine Sauerstoff-Konzentrationen zu sehen. Zusätzlich sind die Raten K_{T_1} und K_{Δ} (gestrichelte Linien) dargestellt. In dieser Abbildung kann man erkennen, dass im Rahmen der Fehlertoleranzen beim Farbstoff Tetraazaporphyrin in EtOD es schwierig ist zu entscheiden, ob es einen Energierücktransfer vom Singulett-Zustand des Sauerstoffs auf den Triplett-Zustand des Farbstoffs gibt, oder nicht. Der Verlauf der Rate β_2 deutet darauf hin, dass ein Energierücktransfer vorhanden ist. Der Verlauf der Rate β_1 hingegen eher nicht. Aus diesem Grund kann nur eine Obergrenze für das Produkt $k_{\Delta T_1}^{\Pi} < 1,6 \mu s^{-2} mM^{-2}$ (Gleichung (3.37)) als Maß für den Energierücktransfer angegeben werden. Aus der Steigung ergibt sich für die Summe, die die Raten zusammenfasst, welche das Quenchen des Farbstoff- T_1 -Zustandes durch Sauerstoff beschreiben, $k_{T_1 O}^{\Sigma} = k_{T_1 O_2} + k_{T_1 \Delta} = (3,8 \pm 0,6) \mu s^{-1} mM^{-1}$. Die Extrapolation des Verlaufs der Abfallrate auf die Sauerstoffkonzentration $[O_2] = 0$ ergibt einen Wert für $K_{T_1}([O_2] = 0) = k_{T_1} + k_{T_1 S_0}[P] = (0,0084 \pm 0,0013) \mu s^{-1}$. Die Extrapolation der Anstiegsrate auf $[O_2] = 0$ ergibt für $K_{\Delta}([O_2] = 0) = k_{\Delta} + k_{\Delta P}^{\Sigma}[P] = (0,035 \pm 0,005) \mu s^{-1}$.

5.4.2 Farbstoffvariation

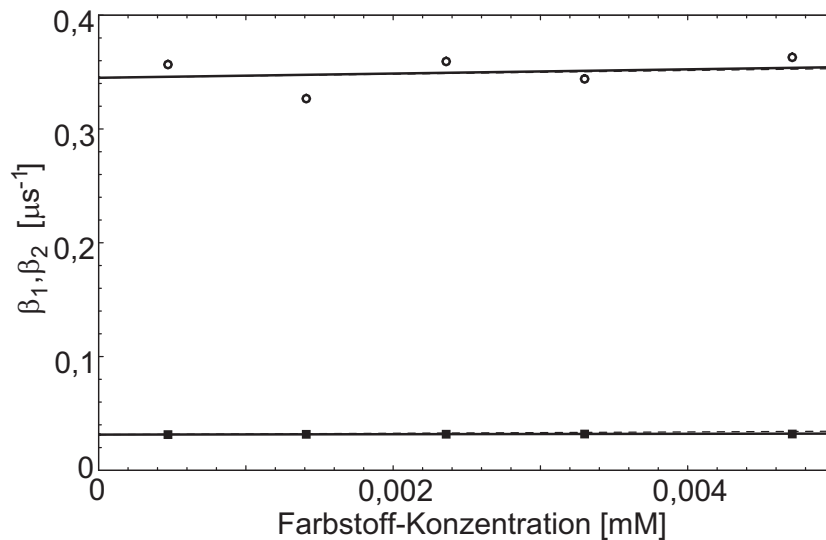


Abbildung 5.11: Verlauf der Raten β_1 und β_2 (durchgezogene Linien) in Abhängigkeit von der Farbstoff-Konzentration. Singulett-Sauerstoff wurde generiert durch Tetraazaporphyrin in EtOD bei 0,0925 mM Sauerstoff. Bei der Anstiegsrate ist ein Fehler von 25 % und bei der Abfallrate ein Fehler von 15 % anzunehmen.

Die Variation der Tetraazaporphyrin-Konzentration in EtOD erfolgte in einem Be-

reich von $0,471 \mu\text{M}$ bis $4,71 \mu\text{M}$, wiederum ohne Zugabe von Quencher. Die durchgeführte Messung ist in Abbildung 5.11 zu sehen. Die Sauerstoff-Konzentration während der Messung betrug $0,0925 \text{ mM}$ (5 % Luftsättigung). Betrachten wir nun die Extrapolation der Raten auf die verschwindende Farbstoffkonzentration $[P] = 0$. K_{T_1} entspricht dann $K_{T_1}([P] = 0) = k_{T_1} + k_{T_1O}^{\Sigma}[\text{O}_2] = (0,35 \pm 0,05) \mu\text{s}^{-1}$. Da $k_{T_1O}^{\Sigma}$ aus Abschnitt 5.4.1 bekannt ist und die Sauerstoff-Konzentration im Experiment $[\text{O}_2]$ ebenfalls, lässt sich k_{T_1} zu $k_{T_1} = (0,0010 \pm 0,0001) \mu\text{s}^{-1}$ bestimmen. Dies entspricht einer Triplett-Lebensdauer von Tetraazaporphyrin von $\tau_{T_1} = (1,0 \pm 0,1) \text{ ms}$. Für K_{Δ} gilt, dass $K_{\Delta}([P] = 0) = k_{\Delta} = (0,031 \pm 0,005) \mu\text{s}^{-1}$. Daraus lässt sich die Singulett-Sauerstoff-Lebensdauer in EtOD bestimmen zu $\tau_{\Delta} = (32 \pm 5) \mu\text{s}$. Die Steigung von K_{T_1} lässt sich bestimmen zu $k_{T_1S_0} = (1,6 \pm 0,3) \mu\text{s}^{-1}\text{mM}^{-1}$ und die Steigung von K_{Δ} zu $k_{\Delta P}^{\Sigma} = (0,6 \pm 0,1) \mu\text{s}^{-1}\text{mM}^{-1}$.

5.4.3 Natriumazidvariation

Die Konzentration des Quenchers Natriumazid wurde zwischen 0 und $2,5 \text{ mM}$ variiert. Die Konzentration des Farbstoffes betrug jeweils $4,71 \mu\text{M}$ an Tetraazaporphyrin und die Konzentration an Sauerstoff $0,0925 \text{ mM}$ (5 % Luftsättigung). Die durchgeführte Messung ist in Abbildung 5.12 zu sehen. Aus diesen Messungen können

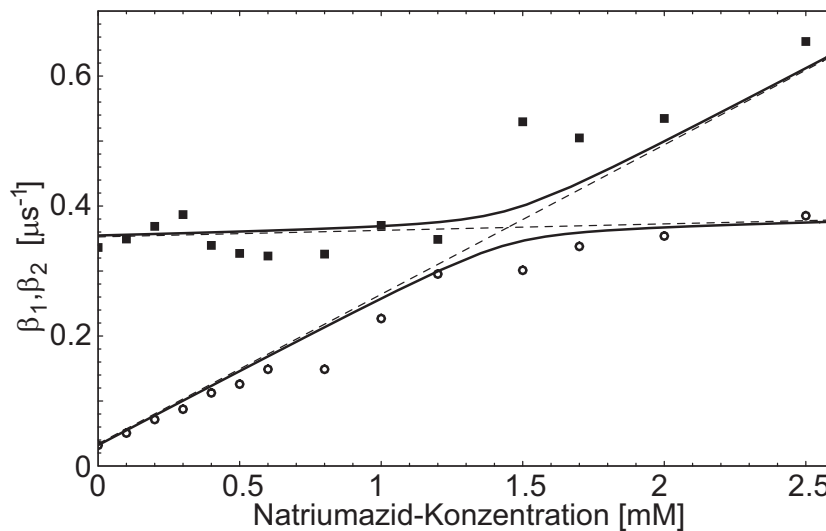


Abbildung 5.12: Verlauf der Raten β_1 und β_2 (durchgezogene Linien) in Abhängigkeit von der Natriumazid-Konzentration. Singulett-Sauerstoff wurde generiert durch $4,71 \mu\text{M}$ Tetraazaporphyrin in EtOD bei $0,0925 \text{ mM}$ Sauerstoff. Bei der Anstiegsrate ist ein Fehler von 25 % und bei der Abfallrate ein Fehler von 15 % anzunehmen.

prinzipiell die beiden Ratenkonstanten k_{T_1Q} (Quenchen des T_1 -Zustandes durch Na-

triumazid) und $k_{\Delta Q}$ (Deaktivierung des Singulett-Sauerstoff-Zustandes durch Natriumazid) aus den Steigungen ermittelt werden. Bei der Variation der Natriumazid-Konzentration konnte eine eindeutige Auswirkung nur auf die Singulett-Sauerstoff-Lebensdauer festgestellt werden, entsprechend $k_{\Delta Q} = (0,25 \pm 0,05) \mu s^{-1} mM^{-1}$. Aufgrund der Messgenauigkeit kann für das schwache Quenchen des Triplett-Zustands nur ein ungenauer Wert angegeben werden mit $k_{T_1Q} = (0,01 \pm 0,01) \mu s^{-1} mM^{-1}$. Eine Zusammenfassung der hier ermittelten Raten und Ratenkonstanten von Tetraazaporphyrin in EtOD findet sich in Abschnitt 9.1.

Kapitel 6

Singulett-Sauerstoff in wässriger Suspension

Um sich, ausgehend von den einfachen Verhältnissen in Lösungsmitteln, denjenigen in lebenden Zellen anzunähern, die an sich zwar relativ einfache biologische Gebilde darstellen, aber verglichen mit Lösungsmittelverhältnissen, aufgrund der Vielzahl an mikroskopischen Umgebungen bereits sehr komplexe Systeme sind, werden im Rahmen der vorliegenden Arbeit Lipidsuspensionen (Phosphatidylcholin-Suspensionen) verwendet, da zum einen Lipiddoppelschichten das konstituierende Gerüst von Zellmembranen sind, zum anderen aber Suspensionen von Lipidtröpfchen verglichen mit Suspensionen von Liposomen relativ einfach hergestellt werden können.

In der Literatur wurde Phosphatidylcholin bereits in Liposom-Suspensionen untersucht [EAF98]. Dabei wurde die Lebensdauer von Singulett-Sauerstoff zu $5\text{ }\mu\text{s}$ in H_2O -Suspension und $71\text{ }\mu\text{s}$ in D_2O -Suspension bestimmt. Daraus wurde die reine Lipidzeit zu $12,2\text{ }\mu\text{s}$ extrapoliert.

In diesem Abschnitt werden nun H_2O -Suspension sowie reines Lipid auf die Lebensdauer von Singulett-Sauerstoff hin untersucht.

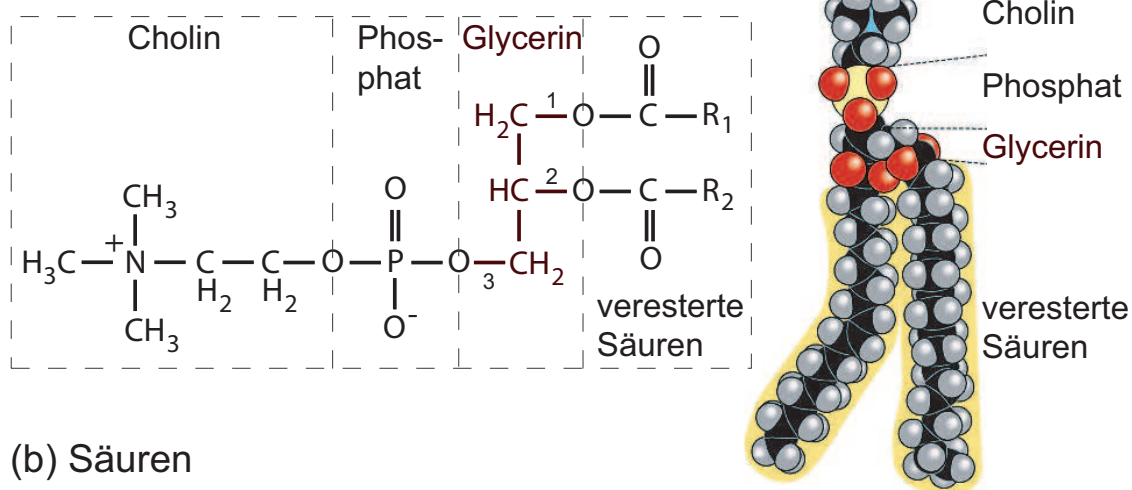
6.1 Material und Methoden

Betrachten wir zunächst das verwendete L- α -Phosphatidylcholin etwas genauer sowie den Prozess der Herstellung einer Suspension.

6.1.1 L- α -Phosphatidylcholin

Zur Präparation der Lipidsuspensionen wurde das Lipid Phosphatidylcholin (Reinheit 99 %, Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland), Strukturformel siehe Abbildung 6.1 (a), hergestellt aus Eigelb) verwendet, da dieses ein Hauptbestandteil von zellulären Membranen ist [HLM82].

(a) Phosphatidylcholin



(b) Säuren

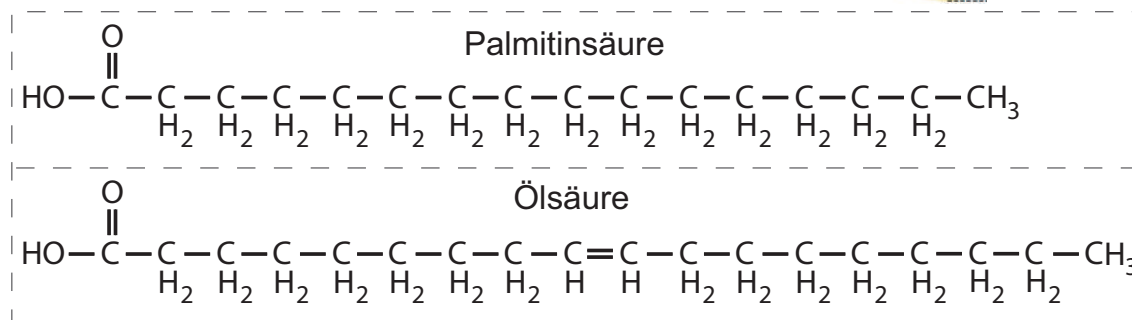


Abbildung 6.1: (a) Strukturformel von L- α -Phosphatidylcholin, bestehend aus dem polaren Cholin-Phosphat-Glycerin-Kopf und den unpolaren veresterten Säure-Schwänzen. R_1 und R_2 sind unverzweigte Kohlenwasserstoffketten die sowohl gesättigt als auch ungesättigt sein können. (b) Palmitinsäure und Ölsäure.

Das Grundgerüst bildet bei allen Phospholipiden ein Glycerinmolekül, bei dem jeweils über Sauerstoffatome zwei langkettige Fettsäuren verestert sind. Beim Verestern werden zwei Moleküle mit OH-Gruppen (hier Glycerin und Säure) über die OH-Gruppen verbunden. Dabei entsteht aus den beiden OH-Gruppen ein Sauerstoff-Verbindungsatom, welches die beiden Moleküle dann verbindet, und ein H_2O -Molekül als Überbleibsel. Die veresterte Fettsäure an Position 1 ist sehr häufig die gesättigte Palmitinsäure (Abbildung 6.1 (b)), während die veresterte Fettsäure an

Position 2 (mittlere Position) oft ein- oder mehrmals ungesättigt ist. An Position 3 ist über ein weiteres Sauerstoffatom Phosphat angebunden, das selbst mit einer weiteren Komponente verbunden ist, welche hochpolar ist oder eine positive Ladung besitzt. Das hier verwendete L- α -Phosphatidylcholin hat Choline in Kombination mit Phosphat. Es ist keine Reinsubstanz, sondern eine Mischung aus verschiedenen Phosphatidylcholinen, die sich in Art (gesättigt, ungesättigt) und Länge der veresterten Fettsäuren unterscheiden. Typischerweise sind 33 % aller veresterten Säuren gesättigte Palmitinsäuren mit 16 Kohlenstoffatomen, 31 % sind einfach ungesättigte (Doppelbindung zwischen dem 9. und 10. Kohlenstoffatom) Ölsäuren mit 18 Kohlenstoffatomen (siehe Abbildung 6.1 (b)), 15 % sind doppelt ungesättigte (Doppelbindung zwischen dem 9. und 10. sowie 12. und 13. Kohlenstoffatom) Linolsäuren mit 18 Kohlenstoffatomen, 13 % sind gesättigte Stearinsäuren mit 18 Kohlenstoffatomen und die restlichen 8 % sind weitere Fettsäuren [S03]. Somit lässt sich eine durchschnittliche Molmasse für ein Gemisch von etwa 768 g/mol bestimmen. Allgemeiner lässt sich die Molmasse als $311,22 \text{ g/mol} + R_1 + R_2$ darstellen und die Summenformel (vgl. Abbildung 6.1 (a)) als $C_{10}H_{18}NO_8PR_1R_2$.

Alle Phospholipide bestehen aus einem langen hydrophoben unpolaren Schwanz (veresterte Fettsäuren) und einem kurzen hydrophilen polaren Kopf (Cholin-Phosphat-Glycerin bei L- α -Phosphatidylcholin). In wässriger Lösung erfolgt dadurch eine Selbstorganisation bei der sich die unpolaren Enden aneinander lagern um nicht mit dem polaren Lösungsmittel Wasser in Berührung zu kommen. Es gibt drei unterschiedliche Strukturen die dabei entstehen können, nämlich Micellen, Liposome und Lamellen (vgl. Abbildung 6.2). L- α -Phosphatidylcholin bildet aufgrund

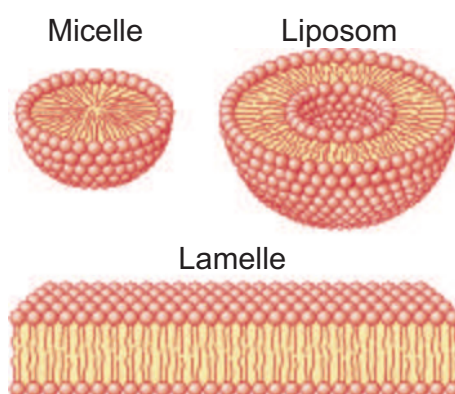


Abbildung 6.2: Anordnung von Phospholipid in Wasser. Der polare Kopf ist als Kugel dargestellt und dem Wasser zugewandt.

seiner sperrigen langen Art insbesondere keine Micellen aus [S94]. Somit bilden sich

hier nur Lipiddoppelschichten.

6.1.2 Herstellung der Lipidsuspension

Bei der Lipidsuspension wurde L- α -Phosphatidylcholin, in das der Farbstoff Photofrin oder ATMPn eingebracht werden soll, mit der Analysewaage von Mettler abgewogen und in H₂O suspendiert. Zum Erleichtern des Abwiegens bzw. Verarbeitens wurde das Lipid mit flüssigem Stickstoff immer wieder abgekühlt. Dabei wurde die bei Raumtemperatur schmierige Substanz pulverförmig. Die frische Suspension wurde aufgeschüttelt und danach im Wärmebad, unter gelegentlichem Schütteln, bei 37 °C für 60 Minuten erwärmt, um eine homogene Suspension zu erhalten.

Analog hierzu wurde der benötigte Farbstoff abgewogen und ebenfalls gelöst, Photofrin in H₂O und ATMPn in EtOH. Anschließend wurden im Fall Photofrin die Lipidsuspension und die Photofrinlösung zusammengeführt. Ab diesem Zeitpunkt wurde, bis zur eigentlichen Messung, in Dunkelheit gearbeitet, damit die mit Photofrin präparierte Suspension nicht durch Licht verändert wurde. Die Konzentration der Lipidsuspension und der Photofrinlösung ist dabei so zu wählen, dass die Endlösung die gewünschte Konzentration an Phosphatidylcholin (15 mg/ml) und Photofrin hat. Diese so präparierte Photofrinsuspension wurde in den Aufbau von Abschnitt 4.1 eingebracht und untersucht.

Zur Präparation mit ATMPn wurde die ATMPn-EtOH Lösung in die wässrige Lipidsuspension von 15 mg/ml Phosphatidylcholin eingefüllt. Wieder wird ab hier bis zur Messung unter Ausschluss von Licht gearbeitet. Um das Ethanol aus der Suspension zu bekommen, wurde die Suspension über Nacht in einem Wasserbad bei 50 °C verdunstet. Vor der Messung wurde das trockene Phosphatidylcholin-ATMPn Gemisch mit H₂O so aufgefüllt, dass sich die gewünschte Phosphatidylcholinkonzentration von 15 mg/ml wieder einstellte. Anschließend wurde erneut die Suspension für 60 Minuten bei 37 °C im Wärmebad unter Schwenken behandelt. Diese so präparierte ATMPn-Suspension wurde ebenfalls in den Aufbau von Abschnitt 4.1 eingebracht und untersucht.

Analog zu den reinen Farbstofflösungen wurden auch hier Suspensionen ohne Photosensibilisator hergestellt und untersucht. Auch hier konnte bei der Anregungswellenlänge von 532 nm keine Singulett-Sauerstoff-Lumineszenz beobachtet werden.

6.2 Lumineszenzmessung

In diesem Abschnitt soll nun die Lumineszenz von Singulett-Sauerstoff in H_2O -Suspension sowie in reinem Lipid untersucht werden.

6.2.1 Lipidsuspension

Betrachten wir zuerst die Phosphatidylcholin-Suspension, wie sie in Abschnitt 6.1.1 hergestellt wurde. In Abbildung 6.3 sind die Lumineszenzsignale von Singulett-Sauerstoff in der Lipid- H_2O Suspension dargestellt. Erzeugt wird der Singulett-

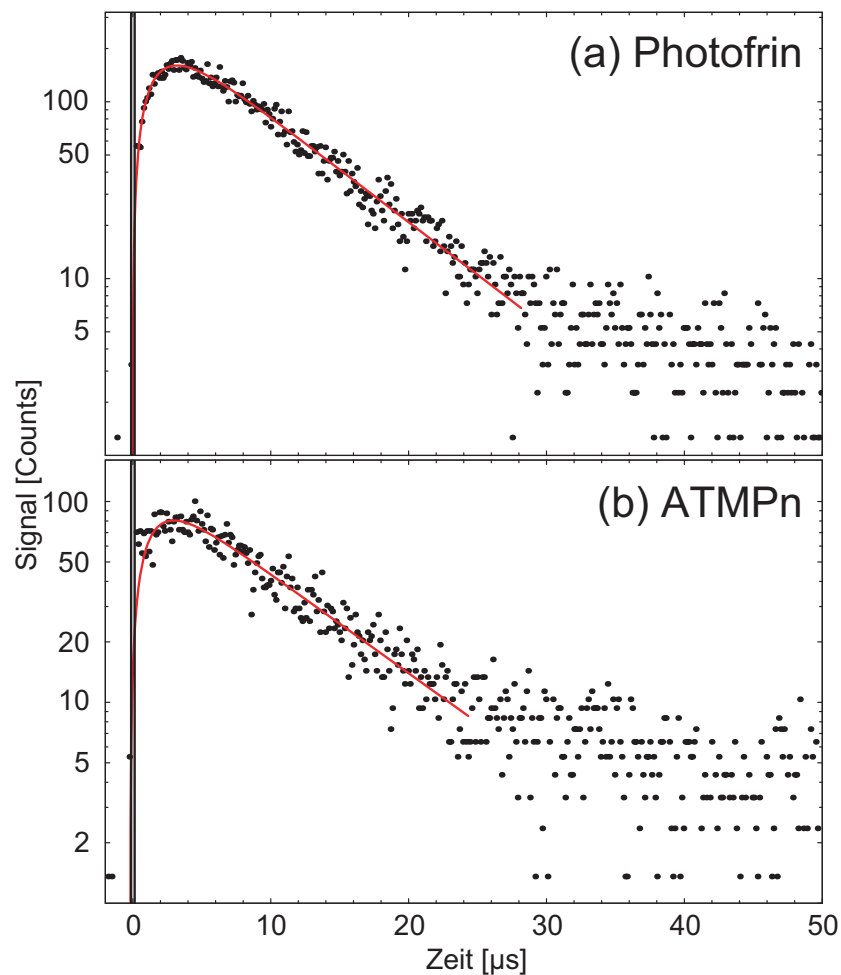


Abbildung 6.3: Singulett-Sauerstoff-Lumineszenzsignal, generiert in Lipid- H_2O -Suspension durch (a) $50 \mu\text{g/ml}$ Photofrin und (b) $50 \mu\text{M}$ ATMPn.

Sauerstoff durch (a) $50 \mu\text{g/ml}$ Photofrin (Laserleistung 100 mW , $2 \cdot 10^4$ Pulse) und (b) $50 \mu\text{M}$ ATMPn (Laserleistung 100 mW , $3 \times 2 \cdot 10^4$). Da sich die Lipidsuspension

ab etwa $4 \cdot 10^4$ Schuss mit dem Laser verändert bzw. ein immer schwächeres Signal liefert, wurde nach $2 \cdot 10^4$ Schuss die Messung beendet. Um das schwache Signal von der ATMPn-Suspension auswerten zu können, wurden drei Messungen zu $2 \cdot 10^4$ Schuss mit je einer neuen Suspension durchgeführt und das Ergebnis addiert. Die Anstiegszeit in Abbildung 6.3 (a) beträgt $\tau_1 = (1,7 \pm 0,4) \mu\text{s}$ und in (b) $\tau_1 = (1,5 \pm 0,4) \mu\text{s}$. Die Lebensdauer von Singulett-Sauerstoff beträgt im Fall Photofrin-Lipid-H₂O-Suspension $\tau_2 = (7,3 \pm 1,1) \mu\text{s}$ und im Fall ATMPn-Lipid-H₂O-Suspension $\tau_2 = (8,8 \pm 1,3) \mu\text{s}$.

6.2.2 Lipidaufstrich

Betrachten wir nun die Relaxation von Singulett-Sauerstoff im reinen Lipid ohne Wasser mit Hilfe des sog. Lipidaufstriches. Hierbei wird die Lipidsuspension (Herstellung siehe Abschnitt 6.1.1) mit dem inkubierten Farbstoff im Dunkeln auf einen Objektträger (Quarzglas SUPRASIL, Hellma Optik, Jena, Deutschland) aufgebracht. Nach ca. 24 h ohne Licht ist das Wasser verdunstet und das reine Lipid mit inkubiertem Photosensibilisator auf dem Objektträger zurückgeblieben. Dieser Objektträger wird dann anstelle der normalen Küvette in den Versuchsaufbau eingebaut.

In Abbildung 6.4 sind die Lumineszenzsignale von Singulett-Sauerstoff in reinem Phosphatidylcholin dargestellt. Generiert wurde der Singulett-Sauerstoff in (a) durch $50 \mu\text{g/ml}$ Photofrin und in (b) durch $50 \mu\text{M}$ ATMPn. In beiden Fällen wurde mit 100 mW Laserleistung bestrahlt und $8 \cdot 10^4$ Durchgänge addiert. Die Anstiegszeit beträgt für Photofrin $\tau_1 = (3,7 \pm 0,9) \mu\text{s}$ und für ATMPn $\tau_1 = (2,4 \pm 0,6) \mu\text{s}$. Die Lebensdauer von Singulett-Sauerstoff im Lipid beträgt für das System Photofrin-Lipid $\tau_2 = (14 \pm 3) \mu\text{s}$ und für das System ATMPn-Lipid $\tau_2 = (13 \pm 3) \mu\text{s}$. Im Lipid scheint innerhalb der Messgenauigkeit, bezüglich Generation und Lebensdauer von Singulett-Sauerstoff, kein Unterschied zwischen dem hydrophilen Farbstoff Photofrin und dem hydrophoben Farbstoff ATMPn zu bestehen. In weiteren, nicht dargestellten, Messungen wurden Lebensdauern von Singulett-Sauerstoff im Lipidaufstrich von bis zu $\tau_2 = (18 \pm 3) \mu\text{s}$ gemessen. Daraus lässt sich nun eine mittlere Lebensdauer für Singulett-Sauerstoff im Lipid zu $\tau_2 = (15 \pm 3) \mu\text{s}$ bestimmen. Für die Lebensdauer von Singulett-Sauerstoff in Lipid existiert in der Literatur eine Abschätzung von $12,2 \mu\text{s}$ [EAF98] die sehr gut mit den gemessenen Werten übereinstimmt.

In Abbildung 6.4 (c) ist das Lumineszenzsignal aus Lipidaufstrich und Lösung, unter Ausschluss des Vermischens von Lipid und Wasser, gezeigt. Der Aufstrich wurde hierbei außen auf die Küvette aufgebracht und die Küvette mit Lösung gefüllt. Im

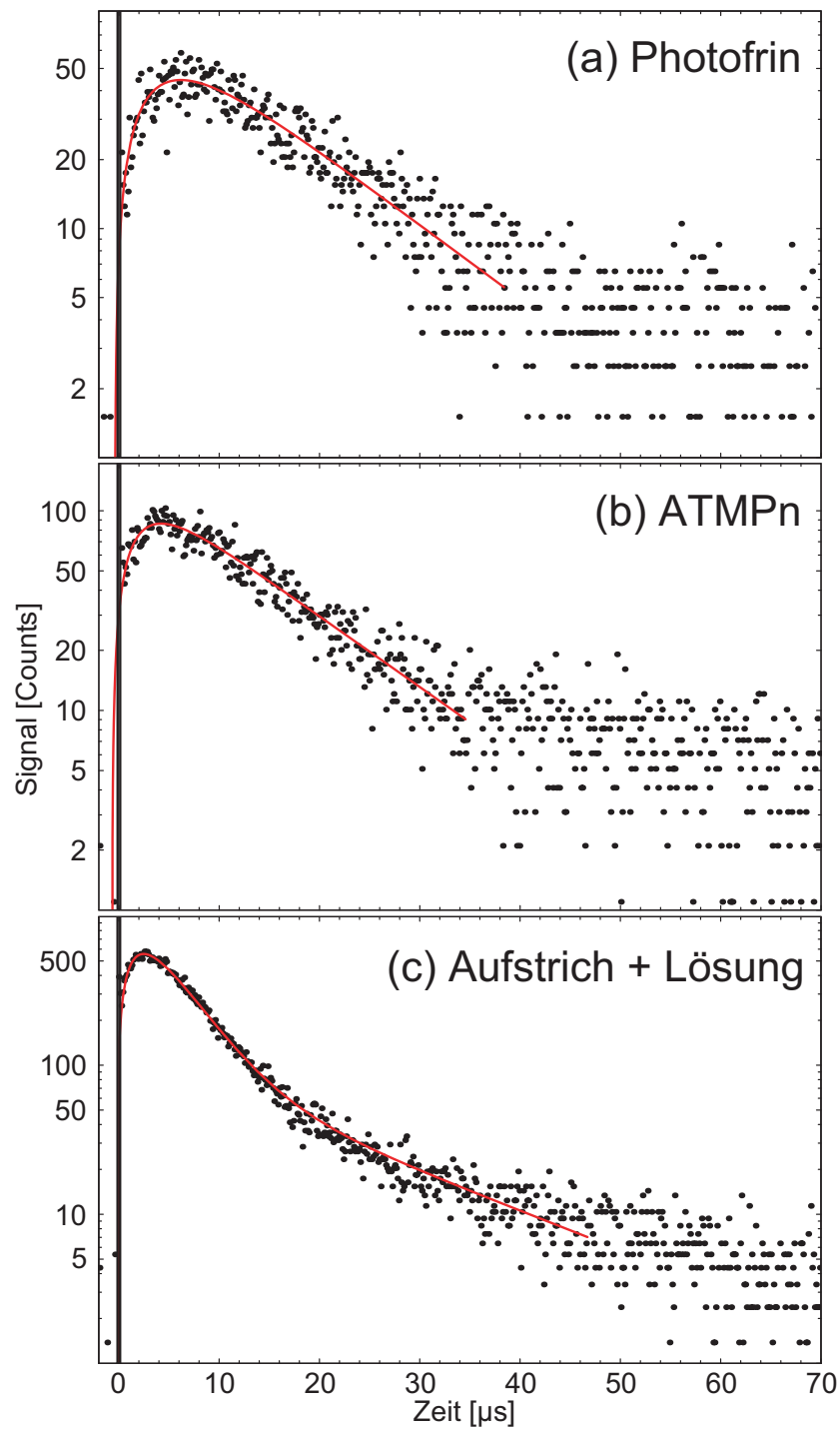


Abbildung 6.4: Singulett-Sauerstoff-Lumineszenzsignal, generiert in reinem Lipid durch (a) 50 $\mu\text{g/ml}$ Photofrin und (b) 50 μM ATMPn. (c) 50 $\mu\text{g/ml}$ Photofrin im Lipidaufstrich und in H_2O -Lösung.

Lipidaufstrich befanden sich 50 $\mu\text{g/ml}$ Photofrin und in der H_2O Lösung wurden ebenfalls 50 $\mu\text{g/ml}$ Photofrin gelöst. Das System wurde mit 100 mW Laserleistung

bestrahlt und $8 \cdot 10^4$ Durchgänge addiert. Die Anstiegszeit beträgt $\tau_1 = (2,0 \pm 0,5) \mu\text{s}$. Im Abklingverhalten sehen wir jedoch zwei exponentielle Abfälle. Für die beiden Abfallzeiten ergeben sich die Werte $\tau_{2a} = (3,5 \pm 0,5) \mu\text{s}$, welcher der Lebensdauer von Singulett-Sauerstoff in H_2O entspricht, und $\tau_{2b} = (16,5 \pm 2,5) \mu\text{s}$, welcher der Lebensdauer von Singulett-Sauerstoff in Phosphatidylcholin entspricht. Es handelt sich also im Wesentlichen um die Summe der Lumineszenzsignale von Singulett-Sauerstoff in H_2O und Lipid.

6.3 Durchlicht- und Fluoreszenzaufnahmen von Lipidsuspensionen

In diesem Abschnitt sollen Durchlicht- und Fluoreszenzaufnahmen von Lipidsuspensionen, die mit dem Mikroskop von Abschnitt 4.2 aufgenommen wurden, betrachtet werden. Hierbei wurde eine 15 mg/ml Phosphatidylcholin- H_2O -Suspension verwendet und 50 μM ATMPn hinzugegeben. Da ATMPn nicht wasserlöslich ist, befindet sich der Farbstoff ausschließlich im Lipid. Die Durchlichtaufnahmen dieser Suspension sind in Abbildung 6.5 (a) dargestellt. Es sind unterschiedlich große Lipidtröpfchen zu sehen, welche eine Größe von bis zu 15 μm haben. Innerhalb der Tröpfchen sind weitere kleinere Strukturen zu erkennen.

Weitere Erkenntnisse liefern die Fluoreszenzaufnahmen aus Abbildung 6.5 (b). Hier ist ersichtlich, dass der Farbstoff nicht homogen im Lipidtröpfchen verteilt ist. Vielmehr werden dünne Lipidschichten sichtbar, die das Tröpfchen außen begrenzen und im Inneren Strukturen bilden. Die dunkleren inneren Bereiche deuten auf Wasser hin, weil im Wasser kein Photosensibilisator gelöst sein kann. Es bilden sich also Tröpfchen aus, die eine Lipid-Hülle haben und im Inneren Wasser oder Wasser-Lipid-Strukturen besitzen. Weiter ist zu erkennen, dass größere Lipid-Tröpfchen stärker fluoreszieren als kleine. Der Hintergrund mit möglicherweise sehr kleinen Tröpfchen, welche kleiner als die Auflösung des Mikroskops (1 μm) sind, bleibt dunkel. Das zu messende Lumineszenzsignal der Suspension wird also hauptsächlich in größeren Lipid-Tröpfchen generiert.

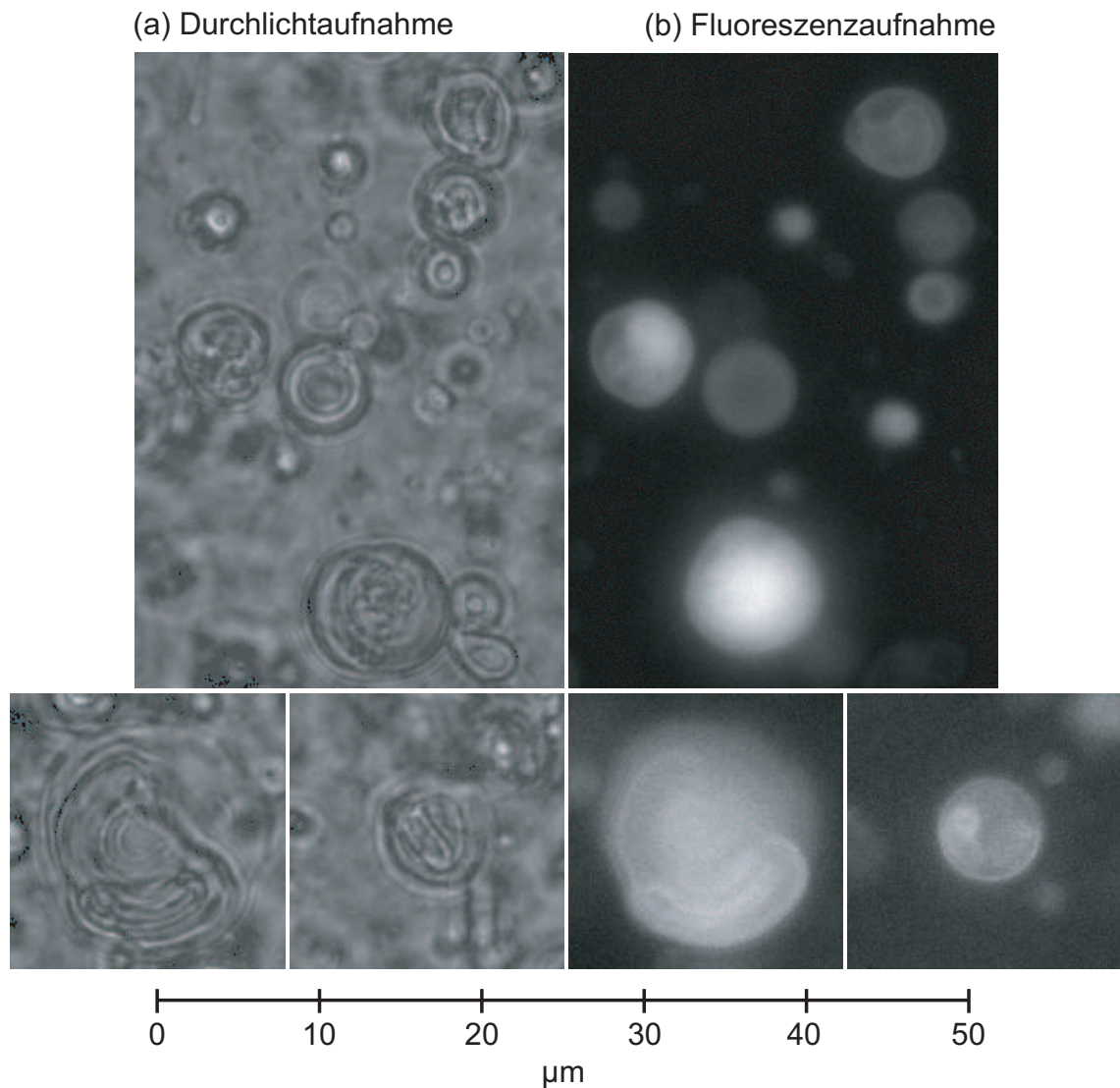


Abbildung 6.5: 50 μM ATMPn in 15 mg/ml Phosphatidylcholin- H_2O -Suspension in der (a) Durchlichtaufnahme und (b) Fluoreszenzaufnahme.

6.4 Interpretation der Messergebnisse

Betrachtet man die Deaktivierung von Singulett-Sauerstoff als statischen Prozess, so ist die Lebensdauer von Singulett-Sauerstoff nur von der direkten Umgebung abhängig. So sollte Singulett-Sauerstoff im Lipid etwa 14 μs leben und im Wasser (H_2O) etwa 3,5 μs . Als Ergebnis sollte in der Lipid-Suspension die Lumineszenz von Singulett-Sauerstoff mit zwei Abklingzeiten abfallen, da diese Lumineszenz eine Überlagerung zweier Lumineszenzen, aus Wasser und Lipid, wäre. Genau diese Überlagerung wurde in Abbildung 6.4 (c) gemessen. Dort wurde Photosensibilisator im Lipid und Photosensibilisator im Wasser räumlich getrennt. In der

Lipid-Suspension ist es aber gänzlich anders. Hier werden keine zwei Abklingzeiten gemessen (vgl. Abbildung 6.3), obwohl auch hier in kleinerem Maßstab eine räumliche Trennung von Wasser und Lipid vorhanden ist, da sich Lipid in Wasser nicht löst und eine Suspension bildet. Es kann sich also bei der Deaktivierung von Singulett-Sauerstoff nicht um einen statischen Prozess handeln. Deshalb nun folgende Überlegungen zur Diffusion von Singulett-Sauerstoff.

Die durchschnittliche Weglänge l , die ein Sauerstoff-Molekül in der Zeit t zurücklegt, ist gegeben durch [SS03]

$$l = \sqrt{6D_0t}. \quad (6.1)$$

D_0 entspricht dabei der Diffusionskonstante von Sauerstoff im jeweiligen Medium. Diese Gleichung kann nun verwendet werden, um die Strecke abzuschätzen, die der Singulett-Sauerstoff von der Erzeugung bis zur Vernichtung im Mittel zurücklegt. Das bedeutet aber auch, dass der Entstehungsort von Singulett-Sauerstoff nicht dem Zerfallsort entsprechen muss. Der Diffusionskoeffizient für Sauerstoff in Phosphatidylcholin bzw. durch Plasmamembranen und Zytoplasma ist in der Literatur mit einem Wert von 0,7 bis $1,4 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$ angegeben [HJM02, K91, BK93, FK95] und der Diffusionskoeffizient in Wasser beträgt $D_{\text{H}_2\text{O}} = 2 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$ [MB81, K91, BK93, FK95]. Um eine Abschätzung für die mittlere Diffusionslänge in der Suspension zu bekommen wird der Diffusionskoeffizient von $D = 1,5 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$ und die Lebensdauer von $\tau_2 = 8 \text{ } \mu\text{s}$ hergenommen. Dies führt unter der Verwendung von Gleichung (6.1) zu einer Diffusionslänge von $l = 0,3 \text{ } \mu\text{m}$.

Die Durchlichtaufnahme der Lipid-Suspension (vgl. Abbildung 6.5 (a)) zeigt, dass die Lipidtröpfchen bis $15 \text{ } \mu\text{m}$ groß sind. Da sich ATMPn ausschließlich und Photofrin hauptsächlich (Verhältnis Wasser zu Lipid etwa 1:9 [GE89]) im Lipid löst, befindet sich der Entstehungsort von Singulett-Sauerstoff im Lipid. Wären die Lipidtröpfchen homogen mit Lipid gefüllt, würde bei einer Diffusionslänge von $l = 0,3 \text{ } \mu\text{m}$ dadurch der meiste Singulett-Sauerstoff sich nur im Lipid bewegen. Das Lumineszenzsignal von Singulett-Sauerstoff sollte deshalb eine Abklingzeit-Komponente von $15 \text{ } \mu\text{s}$, welche der Lipidzeit entspricht, und eine weitere kürzere Komponente, die der im Rand des Lipid-Tröpfchens erzeugten Singulett-Sauerstoff-Moleküle mit Kontakt zum Wasser, haben.

Die Fluoreszenzaufnahmen der Lipid-Suspension (vgl. Abbildung 6.5 (b)) zeigen aber, dass die Lipidtröpfchen nicht homogen gefüllt sind. Vielmehr bildet sich ein Wasser-Lipid-Komplex aus Lipidschichten aus, da insbesondere L- α -Phosphatidylcholin nur Lipiddoppelschichten ausbildet, die von Wasser umgeben sind [S94]. Die Lipiddoppelschicht ist aber nur bis zu 10 nm dick [K05], was deutlich weniger als die

Diffusionslänge von Singulett-Sauerstoff von 300 nm ist. Singulett-Sauerstoff, der im Lipid erzeugt wird, diffundiert also in seiner Lebensdauer durch Wasser und Lipiddoppelschichten und kommt somit mit beiden Medien in Berührung. Dies bedeutet für die Lebensdauer von Singulett-Sauerstoff in Lipidsuspensionen, dass die Lebensdauer eine Zwischenlebensdauer ist, die zwischen Lipidlebensdauer ($(15 \pm 3) \mu\text{s}$) und Wasserlebensdauer ($(3,5 \pm 0,5) \mu\text{s}$) liegt. Somit ist das Ergebnis von etwa $8 \mu\text{s}$ für die Lebensdauer von Singulett-Sauerstoff in Suspension verständlich.

6.5 Simulationen zur Diffusion von Singulett-Sauerstoff in Suspension

In Abschnitt 3.5 wurde gezeigt, wie der zeitliche Verlauf des Lumineszenzsignals von Singulett-Sauerstoff berechnet werden kann. Durch Aufstellen eines Differentialgleichungssystems (Gleichungen (3.9)), welches analytisch lösbar ist, kann die zeitliche Besetzung der Singulett-Sauerstoff-Zustände beschrieben werden. Dieses System beschreibt jedoch nur homogene System, wie z.B. Photosensibilisatoren in Lösungen. Im Fall der Lipidsuspensionen kann man aber nicht mehr von homogenen sprechen, vielmehr sind heterogene Bereiche mit unterschiedlichen Bedingungen vorhanden. In der Suspension gewinnt deshalb die Diffusion von Sauerstoff durch diese unterschiedlichen Bereiche an Bedeutung. Dies bedeutet aber, dass das Differentialgleichungssystem (3.9) durch die Diffusionsgleichung, über das zeitliche Verhalten von Teilchendichten, erweitert werden muss. Dieses erweiterte Differentialgleichungssystem ist aber analytisch nicht lösbar. Aufgrund dieser Überlegungen wurden in unserer Arbeitsgruppe numerische Computersimulationen zur Problemlösung durchgeführt. Die Ergebnisse und Überlegungen zu diesen Simulationen sind ausführlich in den Diplomarbeiten von Thomas Fuß [F05] und Johannes Schwanzl [S05c] zusammengefasst und sollen hier nur kurz wiedergegeben werden.

Als Voraussetzung für die Simulation mussten die Bedingungen für Singulett-Sauerstoff im Lipid und im Wasser experimentell bestimmt werden. Dies geschah durch Variation der Parameter (vgl. Abschnitt 3.6) von Photosensibilisatoren in Lösung (H_2O) und in Lipidaufstrich. Als Photosensibilisator für die Simulation wurde ATMPn gewählt. Dieser löst sich nicht in Wasser und befindet sich somit nur im Lipid. Singulett-Sauerstoff kann also nur im Lipid entstehen und erst dann ins Wasser diffundieren. Da sich im Lipid 3,9-mal mehr Sauerstoff löst als in Wasser [MBB05], muss dies auch während der Simulation, trotz der Diffusion, aufrecht er-

halten bleiben.

Zu Beginn der Simulation werden die Sauerstoffmoleküle gemäß des Ratengleichungssystems (3.9) angeregt. Dabei können aber nur Sauerstoffmoleküle innerhalb des Lipids angeregt werden, da dort der Farbstoff sitzt. Die angeregten Sauerstoffmoleküle diffundieren durch das System und zerfallen, je nach Umgebung, ebenfalls nach dem Ratengleichungssystem. Trägt man nun die Anzahl der Zerfälle von Singulett-Sauerstoff gegen die Zeit auf, erhält man eine Erzeugungs- und Zerfallsstatistik bezüglich des angeregten Sauerstoffs. Diese ist vergleichbar mit den im Labor erzeugten Lumineszenzsignalen.

Als Umgebung für den Singulett-Sauerstoff wurden zwei Varianten untersucht. Ein homogen gefülltes Lipidtröpfchen, welches von Wasser umgeben ist, und eine Kugelschale aus Lipid, welche in sich Wasser hat und ebenfalls von Wasser umgeben ist. In Abbildung 6.6 ist das einfache Modell eines Lipidtröpfchens als Kugelschale dargestellt. Die Kantenlänge des Systems beträgt $6\text{ }\mu\text{m}$. Alle anderen Parameter, wie

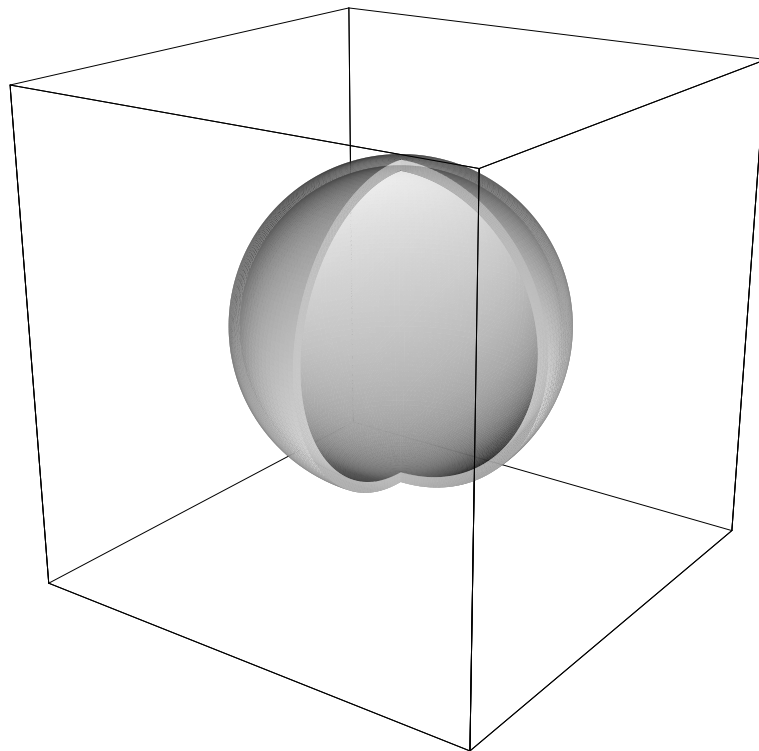


Abbildung 6.6: Einfaches Modell eines Lipidtröpfchens in Form einer Kugelschale, die zur besseren Darstellung aufgeschnitten ist. Die Schale besteht aus Lipid. In und um die Kugel befindet sich Wasser.

Kugeldurchmesser und Schalendicke können beliebig variiert werden. An den Begrenzungsflächen des Würfels herrschen periodische Randbedingungen.

Im Fall des homogen gefüllten Lipidtröpfchens hat sich gezeigt, dass für Tröpfchen größer $1,2\ \mu\text{m}$ Durchmesser die mittlere Lebensdauer von Singulett-Sauerstoff etwa $15\ \mu\text{s}$ entspricht. Dies entspricht aber der Lebensdauer von Singulett-Sauerstoff im reinen Lipid. Erst für kleinere Größen konnte die mittlere Lebensdauer verkürzt werden. Bei einem Durchmesser von etwa $0,5\ \mu\text{m}$ wird eine vergleichbare Lebensdauer ($8\ \mu\text{s}$) gegenüber dem Experiment im Labor erreicht. Die Diffusionslänge im Lipid beträgt nach Gleichung (6.1) $0,3\ \mu\text{m}$ ($D = 1,1 \cdot 10^{-5}$, $t = 15\ \mu\text{s}$). Das bedeutet für große Lipidkugeln (Durchmesser $> 1,2\ \mu\text{m}$), dass die meisten Singulett-Sauerstoff-Moleküle im Lipid bleiben und nur wenige ins Wasser diffundieren. Als Ergebnis dominiert als mittlere Lebensdauer für Singulett-Sauerstoff die Lipidzeit. Für kleinere Kugeln diffundieren, im Verhältnis zu allen Singulett-Sauerstoff-Molekülen, immer mehr angeregte Sauerstoff-Moleküle ins Wasser. Für das Gesamtsystem bedeutet dies, dass die mittlere Lebensdauer von Singulett-Sauerstoff fällt, da Wasser die Lebensdauer verkürzt. Als Ergebnis produziert ein System mit kleinem Lipidtröpfchen ($0,5\ \mu\text{m}$ Durchmesser) die gewünschte Gesamtlebensdauer. Vergleiche mit den Mikroskop-aufnahmen (Abbildung 6.5) zeigen aber, dass die Lipidtröpfchen wesentlich größer (bis $15\ \mu\text{m}$) sind. Außerdem sind keine homogen gefüllten Lipidtröpfchen zu sehen, sondern Lipidtröpfchen mit Lipid und Wasser im Inneren. Das Modell der homogen gefüllten Lipidkugel kann also die Wirklichkeit nur unzureichend beschreiben und wurde deshalb verworfen.

Als weiteres Modell wurde die Kugelschale untersucht (Abbildung 6.6). Die Schale besteht dabei aus Lipid und kann in der Dicke variiert werden. In der Kugel befindet sich Wasser, sowie um die Kugel. Als erstes wurde die Schalendicke variiert, wobei die Gesamtkugel im Durchmesser konstant blieb. Mit abnehmender Schalendicke zeigt sich, dass die mittlere Lebensdauer von Singulett-Sauerstoff abnimmt. Bei einer Schalendicke von etwa $0,15\ \mu\text{m}$ wird dann die vergleichbare mittlere Lebensdauer von Singulett-Sauerstoff ($8\ \mu\text{s}$) zum Labor erreicht. Behält man diese Schalendicke bei und variiert den Außendurchmesser der Kugel ($2 - 5\ \mu\text{m}$) bleibt die mittlere Lebensdauer von Singulett-Sauerstoff konstant. Die Lebensdauer von Singulett-Sauerstoff im System wird also im Wesentlichen von der Schalendicke bestimmt. Innerhalb ihrer Lebensdauer müssen also genügend Singulett-Sauerstoff-Moleküle Kontakt zum Wasser haben, um im Gesamtsystem neben den Singulett-Sauerstoff-Molekülen ohne Kontakt zum Wasser, verkürzend zu wirken.

Die Dicke für Lipiddoppelschichten beträgt etwa $10\ \text{nm}$ [K05]. Die Simulation hingegen liefert eine Schalendicke von $150\ \text{nm}$. Diese Abweichung kann man aus dem Aufbau der Lipidtröpfchen in Abbildung 6.5 erklären. Man kann komplexe Strukturen in den Tröpfchen erkennen. Bei diesen sind möglicherweise viele Lipiddoppel-

schichten zusammengefasst oder übereinander gelagert (aufgrund der Auflösung von etwa $1\text{ }\mu\text{m}$ ist dies nicht im Detail sichtbar). Die Simulation liefert aber nur eine einfache Näherung einer dicken Lipidschicht, die die Wirklichkeit recht gut beschreibt.

Ein weiterer Vorteil der Simulation besteht darin, dass einzelne Singulett-Sauerstoff-Moleküle beobachtet werden können. Somit lassen sich verschiedene Singulett-Sauerstoff-Besetzungen, welche zusammen das Gesamtsignal ergeben, getrennt berechnen. In Abbildung 6.7 ist nun die Anzahl der Singulett-Sauerstoff-Moleküle, die sich im Wasser, im Lipid und im Gesamtsystem befinden, gegen die Zeit aufgetragen. Die Gesamtanzahl der Singulett-Sauerstoff-Moleküle in einer bestimmten

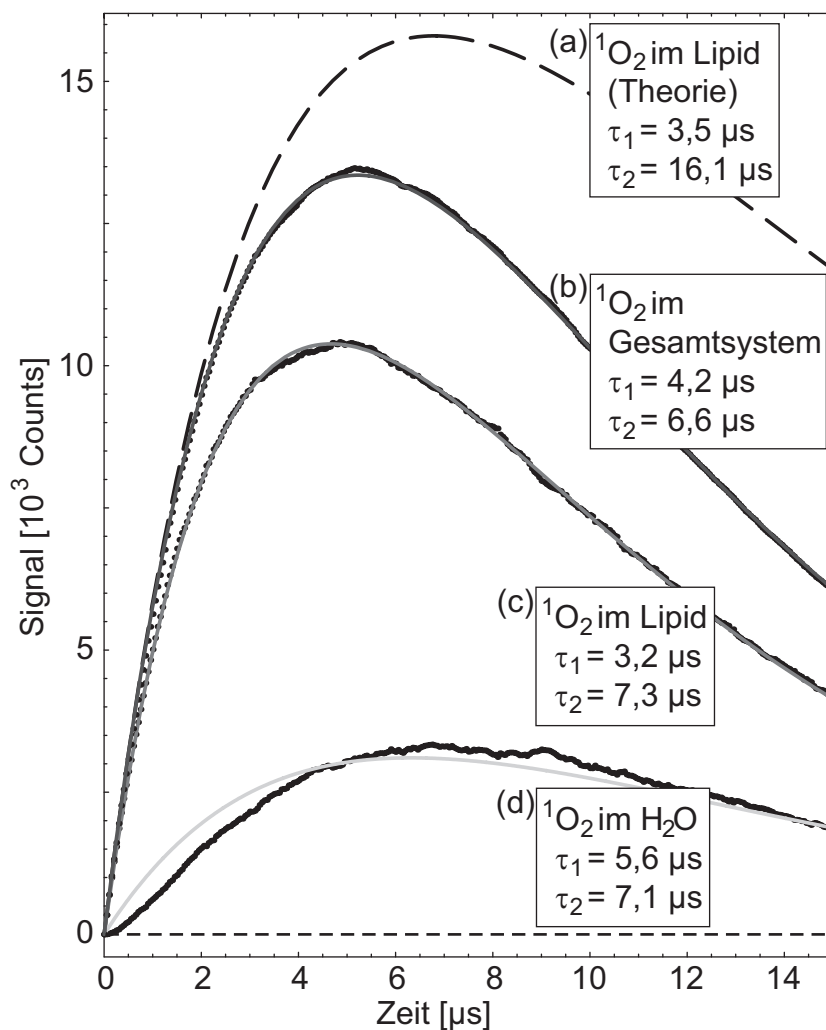


Abbildung 6.7: Simulation zum zeitlichen Verlauf der Singulett-Sauerstoff-Besetzung im Wasser, im Lipid und im Gesamtsystem.

Umgebung ist proportional zur Anzahl der Singulett-Sauerstoff-Moleküle die dort strahlend deaktiviert werden. Deshalb ist auch diese Darstellung vergleichbar mit

der im Labor erzeugten Lumineszenz.

Das simulierte Schalensystem hatte einen Lipidkugeldurchmesser von $5\ \mu\text{m}$ und einen Schalendurchmesser von $0,1\ \mu\text{m}$. Beim analytisch berechneten Verlauf ((a) gestrichelte Linie) der Singulett-Sauerstoff-Besetzung im Lipid ohne Diffusion ist die Anstiegsrate β_1 durch die Lebensdauer des Farbstoff- T_1 -Zustands bestimmt, während die Abfallrate β_2 der Kehrwert der Lebensdauer von Singulett-Sauerstoff im Lipid ist. Die Simulationskurve der Singulett-Sauerstoff-Moleküle im Lipid ((c) gepunktete Linie) zeigt eine kürzere Anstiegs- als auch Abfallzeit gegenüber der analytischen Kurve (a). Die Diffusion ins Wasser wirkt sich wie ein zusätzlicher Deaktivierungsmechanismus (größere Rate) auf den Verlauf der Singulett-Sauerstoff-Besetzung im Lipid (auf beide Zeiten) aus. Außerdem befinden sich durch die Diffusion im Mittel weniger Singulett-Sauerstoff-Moleküle im Lipid. Trotz dieser Abweichungen ist es möglich, den Verlauf noch recht gut durch zwei Exponentialfunktionen, analog zur Gleichung (3.15) des Ratengleichungssystems (3.9), wiederzugeben ((c) durchgezogene Linie).

Für die Besetzung des Singulett-Sauerstoff-Zustands, der sich im H_2O befindlichen Moleküle (d), ist dies nicht zu erwarten. Alle hier vorhandenen Singulett-Sauerstoff-Moleküle sind durch Diffusion aus dem Lipid gekommen und dies kann nicht von unserem Differentialgleichungssystem (3.9) erfasst werden. Der zeitliche Verlauf der Besetzung wird durch zwei Komponenten bestimmt. Durch die Nachlieferung von Singulett-Sauerstoff aus dem Lipid und durch die Lebensdauer von Singulett-Sauerstoff im Wasser. Es fällt auf, dass die Abklingzeit der Besetzung der ins Wasser diffundierten Singulett-Sauerstoff-Moleküle, mit $7,1\ \mu\text{s}$ länger ist als die Lebensdauer von Singulett-Sauerstoff in Wasser ($3,5\ \mu\text{s}$). Dies liegt an der Nachlieferung von Singulett-Sauerstoff durch die Diffusion aus dem Lipid in das Wasser. Dieser, aufgrund der Singulett-Sauerstoff-Lebensdauer in Lipid von $15\ \mu\text{s}$, langlebige Prozess überlagert sich mit den kurzlebigen Zerfallsprozess von Singulett-Sauerstoff im Wasser. Durch die Diffusion wird somit eine längere Lebensdauer von Singulett-Sauerstoff im Wasser vorgetäuscht.

Die Summe der Singulett-Sauerstoff-Besetzungen, der im Wasser und der im Lipid befindlichen Sauerstoff-Moleküle, ergibt die Besetzung des Gesamtsystems (b). Man erkennt, dass sich die Diffusion aus dem Lipid ins Wasser auf die Besetzung des Gesamtsystems, gegenüber dem System im Lipid ohne Diffusion (a), auswirkt. Die Anstiegszeit verlängert sich und die Abfallzeit verkürzt sich. Dieses Ergebnis stimmt aber gut mit den experimentellen Ergebnissen (vgl. Abbildung 6.3) überein und es lässt sich gut durch zwei Exponentialfunktionen beschreiben.

Kapitel 7

Singulett-Sauerstoff in zellulärer Umgebung

Über viele Jahre wurde versucht, die Lumineszenz von Singulett-Sauerstoff in komplexen lebenden Strukturen wie Zellen zu detektieren. Aufgrund der Annahme, dass Singulett-Sauerstoff durch H_2O stark gequencht wird, wurden hauptsächlich D_2O -Zell-Suspensionen untersucht [GR92, BK92, BKC98, OZM99]. Die dabei detektierten Lebensdauern von Singulett-Sauerstoff betrugen 30 bis 50 μs . Diese Lebensdauer wurde D_2O zugeordnet und nicht den Zellen. Es wurde angenommen, dass der Singulett-Sauerstoff in den Zellen durch die Proteine (Lebensdauer von Singulett-Sauerstoff bei Proteinen $< 0,5 \mu\text{s}$ [WHR95]) sehr stark gequencht wird und somit kein Lumineszenzsignal aus der Zelle detektiert werden kann [BK92].

In Folgenden soll nun gezeigt werden, dass eine direkte Detektion von Singulett-Sauerstoff in lebenden Zellen doch möglich ist. Als Zellen wurden HT29-Zellen (menschliche Krebszellen aus dem Darm) verwendet. Diese haben eine vergleichsweise geringe Konzentration an Proteinen in der Zellmembran und eine höhere Konzentration an Lipiden [ALF85]. Aufgrund der kurzen Lebensdauer von Singulett-Sauerstoff bei Proteinen ($< 0,5 \mu\text{s}$ [WHR95]) und der dagegen langen Lebensdauer von Singulett-Sauerstoff im Lipid ($(15 \pm 3) \mu\text{s}$) sollte die Gesamtlebensdauer von Singulett-Sauerstoff in Zellen ansteigen. Durch die längere Lebensdauer und der damit verbundenen höheren Lumineszenzsignalstärke sollte sich die Möglichkeit zur direkten Detektion von Singulett-Sauerstoff in den Zellen verbessern. Als Lösungsmittel wurde H_2O verwendet. Singulett-Sauerstoff hat in H_2O eine Lebensdauer von $(3,5 \pm 0,5) \mu\text{s}$. Sollte also ein Lumineszenzsignal von Singulett-Sauerstoff gemessen werden, das eine längere Lebensdauer als das für H_2O hat, so muss das Signal aus

den Zellen stammen.

Dieses Kapitel beschäftigt sich mit der Generierung von Singulett-Sauerstoff in zellulärer Umgebung. Es werden hierbei Zusammenhänge zwischen der Lebensdauer und dem Entstehungsort von Singulett-Sauerstoff hergestellt. Der Entstehungsort ist dabei gleich der Lokalisation des erzeugenden Photosensibilisators. Durch die Diffusion von Singulett-Sauerstoff innerhalb seiner Lebensdauer entspricht der Entstehungsort nicht unbedingt den Aufenthaltsort von Singulett-Sauerstoff.

7.1 Material und Methoden

Zuerst wollen wir uns den Aufbau einer Zelle sowie den Prozess der Herstellung einer Zell-Suspension etwas genauer betrachten.

7.1.1 Aufbau einer eukaryotischen Zelle

In der Natur existieren zwei grundverschiedene Zellgruppen, prokaryotische und eukaryotische Zellen, die sich aufgrund ihrer Größe und internen Struktur unterscheiden. Zu den von der Struktur her einfachen prokaryotischen Zellen gehören die Bakterien, während Pilze, Pflanzen und Tiere strukturell komplexe eukaryotische Zellen besitzen. In diesem Kapitel beschäftigen wir uns ausschließlich mit HT29-Zellen die zu den eukaryotischen Zellen gehören. Die bakteriellen prokaryotischen Zellen werden in Kapitel 8 behandelt.

Die eukaryotische Zelle ist die grundlegende, strukturelle und funktionelle Einheit aller Lebewesen. Der menschliche Körper besteht, je nach individuellem Körpergewicht, aus 10 bis 100 Billionen Zellen. Eine eukaryotische Zelle ist in Abbildung 7.1 schematisch dargestellt.

Betrachten wir zuerst die für uns wichtigen Zellbestandteile, wie die Plasmamembran, den Zellkern, die Mitochondrien und die Lysosomen. Die Zellwand (Plasmamembran) umgibt die Zelle und trennt das Innere der Zelle von der Umgebung. Sie besteht, ebenso wie die Membranhüllen einiger Zellorganellen, aus einer Lipiddoppelschicht, wobei die hydrophoben Enden der Lipide zueinandergewandt sind. In diese mehr oder weniger flüssige Doppelschicht sind Proteine ein- und angelagert, die unterschiedlich weit in sie hinein- oder sogar durch sie hindurchreichen.

In Abbildung 7.2 ist der schematische Aufbau der Plasmamembran zu sehen. Die Außenseite der meisten Membranproteine sowie ein kleiner Prozentsatz der Phos-

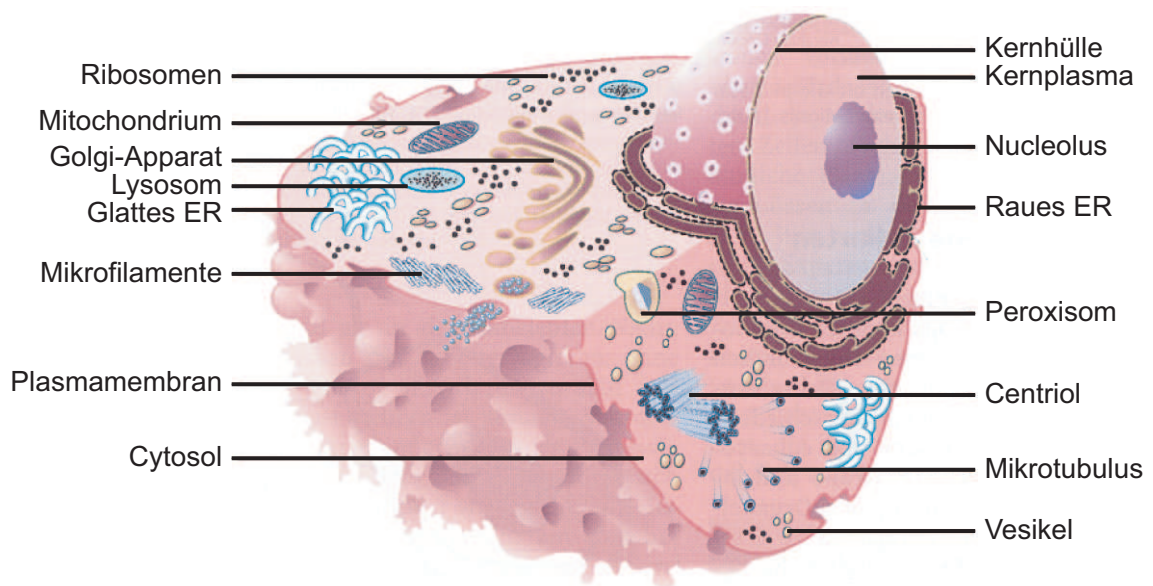


Abbildung 7.1: Die Struktur einer eukaryotischen Zelle vom Tier. ER steht für endoplasmatisches Retikulum. Anmerkung: Die Organellen sind nicht im richtigem Maßstab abgebildet. Quelle: [K05]

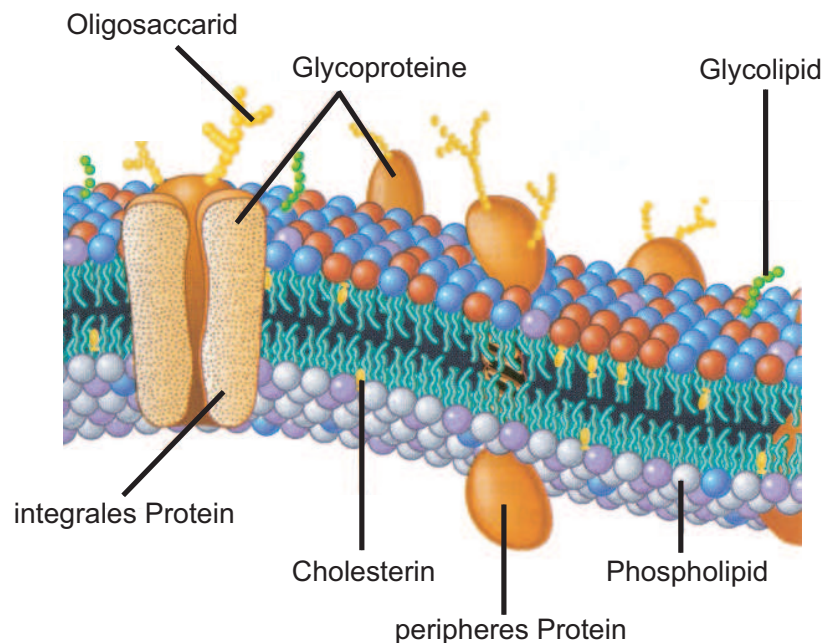


Abbildung 7.2: Die schematische Struktur der Plasmamembran von eukaryotischen Zellen. Quelle: [K05]

pholipide enthalten kurze Zuckerketten, was sie zu Glycoproteinen und Glycolipiden macht. Die beiden Lagen der Doppelschichten enthalten unterschiedliche Lipide, was durch die verschieden gefärbten Kopfgruppen angedeutet wird. Man

geht davon aus, dass die äußere Lage Mikrodomänen aus Klustern spezifischer Lipidspezies enthält.

Lipophile und kleine, ungeladene aber polare Moleküle, wie beispielsweise Wassermoleküle, können durch Diffusion in die Zelle gelangen oder diese verlassen. Dabei folgen sie immer dem Konzentrationsgefälle, mit dem Bestreben dieses auszugleichen. Größere Moleküle wie Ionen, Zucker oder Aminosäuren, für die die Lipiddoppelschicht ohne Proteine unüberwindlich wäre, können passiv ohne jegliche Zuführung von Energie von außen oder von der Zelle in Richtung eines Konzentrations- oder Potentialgefälles transportiert werden. Dies geschieht mit Hilfe von Membrantransport-Proteinen, wobei es zwei Möglichkeiten (Ionenkanal und Carrier) gibt. Beim aktiven Transport können Stoffe auch gegen ein Konzentrationsgefälle durch die Membran transportiert werden, verbrauchen dann aber Energie, die in Form von ATP (Adenosintriphosphat) zur Verfügung gestellt wird. Die Größe der Moleküle ist dabei unwichtig. Beim primär aktiven Transport wird ein Ion durch eine sogenannte Ionenpumpe von der Seite der niedrigeren auf die Seite der höheren Konzentration gepumpt. Der sekundär aktive Transport befördert ein Ion passiv entlang seines Konzentrationsgradienten und nutzt dabei die potentielle Energie dieses Gradienten aus, um ein zweites Substrat gegen dessen Konzentrationsgradienten in gleicher Richtung (Symport) bzw. in entgegengesetzter Richtung (Antiport) zu transportieren.

Der häufig kugelförmige Zellkern ist das größte Zellorganell (Abbildung 7.1). Die Kernhülle ist ein flacher, membranumgrenzter Raum, der von Kernporen durchsetzt ist. Durch diese Poren können Makromoleküle zwischen dem Zytoplasma der Zelle und dem Karyoplasma des Kerns, welches Proteine und die Nukleinsäuren RNA und DNA enthält, ausgetauscht werden. Im Bereich des Nucleolus liegen besondere Abschnitte der DNA mehrerer Chromosomen, die als Nucleolus-Organisator-Regionen (NOR) bezeichnet werden.

Die Mitochondrien sind von einer glatten Membran umgeben, der eine innere Membran folgt, die zur Oberflächenvergrößerung tief gefaltet ist. Mitochondrien dienen u.a. der Energiegewinnung der Zelle. Bei der Kohlenhydrat- und Lipidoxidation entsteht CO_2 und H_2O unter O_2 -Verbrauch. Die so gewonnene Energie wird in Form von Adenosintriphosphat (ATP) gespeichert und steht für Stoffwechselvorgänge zur Verfügung.

Lysosomen sind enzymhaltige Vesikel (Bläschen), die meist dem endoplasmatischen Retikulum (ER) oder dem Golgi-Apparat entstammen (primäre Lysosomen) und dem Proteintransport sowie dem Abbau von aufgenommenen Stoffen dienen (sekundäre Lysosomen). Desweiteren gibt es sogenannte Autolysosomen, die zelleige-

nes Material und ganze Zellorganellen abbauen, was zur ständigen Erneuerung der Organellen und der Beseitigung überflüssiger Strukturen beiträgt. Lysosome sind winzige Bläschen ($< 100\text{ nm}$ [K05]), die von einer Membran (einfache Lipiddoppelschicht) umschlossen sind.

Im Folgenden seien nun der Vollständigkeit halber die restlichen Zellbestandteile erwähnt. Das endoplasmatische Retikulum (ER) ist ein flaches, röhren- und bläschenförmiges Membransystem. In den vom ER abgespalteten Bläschen (Vesikeln) können Stoffe gespeichert oder transportiert werden. Raues und glattes ER unterscheidet sich in seiner Funktion. Während das raue ER Transmembran- und sekretorische Proteine herstellt, spielt das glatte ER eine wichtige Rolle in mehreren metabolischen Prozessen. Es wird für die Synthese verschiedener Lipide und Steroide (Hormone) benötigt, sowie für den Kohlenstoffmetabolismus, die Entgiftung der Zelle, und zur Einlagerung von Kalzium.

Der Golgi-Apparat besteht aus Stapeln von untereinander verbundenen, membranumgrenzten Hohlräumen, den Membranzisternen. Er dient hauptsächlich Sekretionsvorgängen, in deren Verlauf Stoffe von einer Membran umgeben, als Golgi-Vesikel, zur Plasmamembran transportiert und ins Zelläußere abgegeben werden.

In den Ribosomen, etwa 25 nm großen, kugelförmigen Zellorganellen, vollzieht sich die Proteinsynthese. Sie liegen frei im Zytoplasma (Cytosol) der Zelle oder am endoplasmatischem Retikulum (ER).

Peroxisomen sind evolutionär sehr alte Zellorganellen und gelten als die ersten Entgiftungsapparate, die mit dem Auftreten einer sauerstoffhaltigen Atmosphäre erforderlich wurden. Es handelt sich um kleine ($0,5\text{ }\mu\text{m}$ Durchmesser), membranumhüllte Vesikel, die sich im Cytoplasma einer Zelle befinden. In diesen räumlich abgetrennten Bereichen (Kompartimenten) können, durch die Membran geschützt, Reaktionen ablaufen, die für den Organismus, würden sie im Cytoplasma erfolgen, gefährlich wären.

Als Centriole (auch Zentriole oder Zentralkörperchen) bezeichnet man ein Zellkörperchen (Organell), das an der Organisation des Chromatins beteiligt ist und eine wichtige Rolle bei der mitotischen Zellteilung spielt, da es an der Bildung des Spindelapparats beteiligt ist.

Mikrotubuli erfüllen sehr wichtige Aufgaben in den Zellen. An den Mikrotubuli entlang werden Vesikel und Granulae durch die Zellen transportiert. Während der Zellteilung bilden sie den Spindelapparat aus. Mikrofilamente dienen ebenfalls als Schiene für Vesikel die sich daran fortbewegen.

Vesikel sind mikroskopisch kleine, rundlich bis ovale Bläschen in der Zelle, die von einer einfachen Membran umgeben ist. Die Vesikel bilden damit eigene Zellkompar-

timente, in denen unterschiedliche zelluläre Prozesse ablaufen. Je nach Art der in ihnen nachweisbaren Enzyme unterscheidet man verschiedene Typen von Vesikeln: Lysosomen, Microbodies, Peroxisomen und Glyoxysomen.

7.1.2 Erstellung der Zellsuspensionen

Zur Herstellung von Zellsuspensionen wurden immortalisierte Kolonkarzinom-Zellen (HT29, bösartiger Tumor des Dickdarms [P94]) verwendet. Zum einen werden Kolonkarzinome unter Verwendung von Photofrin als Photosensibilisator mit Hilfe der PDT behandelt werden, zum anderen weisen HT29-Zellen, verglichen mit anderen Zellstämmen, eine relativ niedrige Protein-Konzentration und damit eine relativ hohe Lipid-Konzentration in den Membranen auf. Dies dürfte sich aufgrund der hohen Quenchingratenkonstante von Proteinen ($k_{\Delta Q} = 1,1 \cdot 10^4 \text{ g}^{-1} \text{ s}^{-1}$ [BK92], entspricht einer Lebensdauer von Singulett-Sauerstoff bei Proteinen von kleiner $0,5 \mu\text{s}$), verglichen mit der langen Lebensdauer von Singulett-Sauerstoff im Lipid ($\tau_2 = 15 \mu\text{s}$), positiv auf die zu erwartende Lumineszenzintensität auswirken.

Die verwendeten HT29-Zellen wurden an der Klinik und Poliklinik für Dermatologie der Universität Regensburg in Gewebekulturschalen (Falcon, Franklinlakes, USA) unter Standardkulturbedingungen (37°C , 8 % CO_2 in H_2O -gesättigter Atmosphäre) in sterilen Brutschränken gezüchtet. Als Kulturmedium wurde Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland) unter Zusatz von 10 % fötalem Kälberserum (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland), 1 % L-Glutamin und 1 % Streptomycin/Penicillin (Gibco, Eggenstein) eingesetzt. Ein Mediumwechsel erfolgte in regelmäßigen Abständen dreimal pro Woche. Die Inkubation erfolgte in der jeweiligen Konzentration des Photosensibilisators im Überstand aus DMEM z.B. für Photofrin für Zeitdauern von 90 Minuten und 24 Stunden. Zur Zellernte wurde der Überstand abgesaugt und die Zellen mit einer phosphatgepufferten, physiologischen Salzlösung (PBS), bestehend aus 9,55 g/l NaCl und einigen anderen Ionen (Biochrom, Berlin) in H_2O , gespült. Anschließend erfolgte die Inkubation der Zellen mit 0,05 % Trypsin/0,02 % Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA, Gibco) in PBS für wenige Minuten bei 37°C , wodurch ein Ablösen vom Kulturflaschenboden erreicht wird. Die Trypsinaktivität wurde durch Zugabe von DMEM abgestoppt. Zur Trennung der abgelösten Zellen vom Überstand wurde dieser samt den abgelösten Zellen mit einer Pipette abgenommen. Nach Zentrifugation mit 1200 min^{-1} für fünf Minuten wurde erneut der Überstand abgesaugt. Die Bestimmung der Gesamtzahl der

so erhaltenen Zellen erfolgte unter Verwendung eines Lichtmikroskops und einer Neubauer-Zählkammer nach Zugabe eines definierten Volumens (20 ml) DMEM. Die Standardkonzentration von $8 \cdot 10^6$ inkubierten Zellen pro Milliliter Suspension wurde durch erneutes Absaugens des DMEM und anschließender Zugabe eines entsprechenden Volumens PBS erhalten.

Zusätzlich wurden in der gleichen Weise Proben ohne Photosensibilisator hergestellt. Es soll sichergestellt werden, dass neben den Farbstoff keine andere Substanz Singulett-Sauerstoff generiert. Erwartungsgemäß erzeugten diese Leer-Messungen kein Lumineszenzsignal bei Anregung mit 532 nm.

7.1.3 Probenerstellung zur subzellulären Lokalisation des Photosensibilisators

Zur Bestimmung der subzellulären Lokalisation von Photofrin und ATMPn in HT29-Zellen wurden Kolokalisationsaufnahmen der Fluoreszenz von Photofrin, ATMPn und zweier weiterer sogenannter Organellfarbstoffe unter Verwendung des Fluoreszenzmikroskops (siehe Abbildung 4.3) gemacht. Dazu wurden die Zellen in Kulturschalen unter Standardkulturbedingungen (siehe vorher) auf Mikroskop-Objektträgern gezüchtet. Für die Inkubation der HT29-Zellen mit Organellfarbstoffen wurde eine Lösung des jeweiligen Farbstoffs in bestimmter Konzentration in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) hergestellt und für die jeweilige Inkubationsdauer auf den Zellen belassen. Da sowohl für die verwendeten Organellfarbstoffe wie auch für den Photosensibilisator Photofrin bzw. ATMPn verschiedene Inkubationszeiten verwendet wurden, musste der Startpunkt der Inkubation so gewählt werden, dass die Inkubationszeiten zum gleichen Zeitpunkt endeten. Nach Ablauf der Inkubationszeiten wurde der Überstand aus DMEM abgesaugt und die Zellen mehrmals mit PBS gewaschen. Zum Einfärben des Zellkerns wurde Hoechst 33342 (Molecular Probes, Eugene, USA) verwendet. Bei ihm handelt es sich um einen weit verbreiteten Farbstoff. Er dringt sehr leicht in lebende Zellen ein und fluoresziert blau nach Bindung an die DNA. Die Inkubationszeit betrug zehn Minuten mit einer Inkubationskonzentration von $2 \mu\text{M}$. Die Mitochondrien wurden mit Rhodamin 6G (SigmaSigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) eingefärbt, welches sehr schnell in Zellen eindringt, sich in den Mitochondrien akkumuliert und dort mit Cardiolipin ein unlösliches Salz bildet. Die Inkubationszeit mit Rhodamin 6G betrug fünf Minuten mit einer Inkubationskonzentration von $50 \mu\text{g/l}$. Zur Darstellung der Lyso-

somen wurde LysoTrackerGreen (Molecular Probes, Eugene, USA) verwendet. Die Substanz kann die Plasmamembran ungehindert durchdringen und reichert sich bevorzugt in sphärischen Zellorganellen wie Lysosomen an. Die Inkubationszeit betrug zwei Stunden mit 5 μM .

7.2 Bestimmung der Lokalisation der Photosensibilisatoren

In diesem Abschnitt werden Falschfarbendarstellungen der Koloisationsaufnahmen gezeigt, welche von Sebastian Habeker im Rahmen seiner Diplomarbeit aufgenommen und ausgewertet wurden [H01]. Dabei ist die Farbe Blau gleichzusetzen mit der Fluoreszenz des Farbstoffes Hoechst 33342, welcher im Zellkern lokalisiert ist, die Farbe Grün bezeichnet die Fluoreszenz von Rhodamin 6G, das zum Einfärben der Mitochondrien verwendet wurde, bzw. von LysoTrackerGreen, das die Lysosome darstellt. Die Farbe Rot deutet die Fluoreszenz von Photofrin bzw. ATMPn und damit deren subzelluläre Lokalisation an. Die Falschfarbenbilder entstehen durch eine Überlagerung der einzelnen Fluoreszenzbilder, des jeweiligen Zellbestandteils und seines Lokalisationsfarbstoffes, die nacheinander aufgenommen werden. Das Zusammenfügen und Nachbearbeiten der Bilder geschieht am PC. Die Durchlichtaufnahmen zeigen kleine Strukturen der Zellen die aufgrund der Auflösung des Mikroskops von etwa 1 μm nicht ausgewertet werden können. Die Durchlichtaufnahmen dienen nur dem besseren Verständnis gegenüber den Fluoreszenzbildern, da bei diesen nur Farbflecken zu sehen sind und nicht, wie bei den Durchlichtaufnahmen, die Zellen an sich.

In Abbildung 7.3 sind die Fluoreszenzaufnahmen (a) und Durchlichtaufnahmen (b) von HT29-Zellen zu sehen, die mit 5 $\mu\text{g/ml}$ Photofrin 90 Minuten inkubiert wurden. Als Marker wurden zusätzlich der Farbstoff Hoechst 33342 (Zellkern), LysoTrackerGreen (nur oben, Lysosome) und Rhodamin 6G (nur unten, Mitochondrien) verwendet. Photofrin kann die Barriere der Plasmamembran nur relativ langsam überwinden und sitzt nach 90 Minuten Inkubationszeit noch immer in der Plasmamembran bzw. den äußeren Bereichen der HT29-Zelle. Dies ist durch das rote Leuchten (Photofrin) am Rand der Zelle zu sehen. In der Dissertation von Roland Engl [E03] wurden weitere Fluoreszenzaufnahmen von HT29-Zellen bei unterschiedlicher Photofrinkonzentration (90 Minuten mit 5 $\mu\text{g/l}$, 20 $\mu\text{g/l}$ und 50 $\mu\text{g/l}$) aufgenommen.

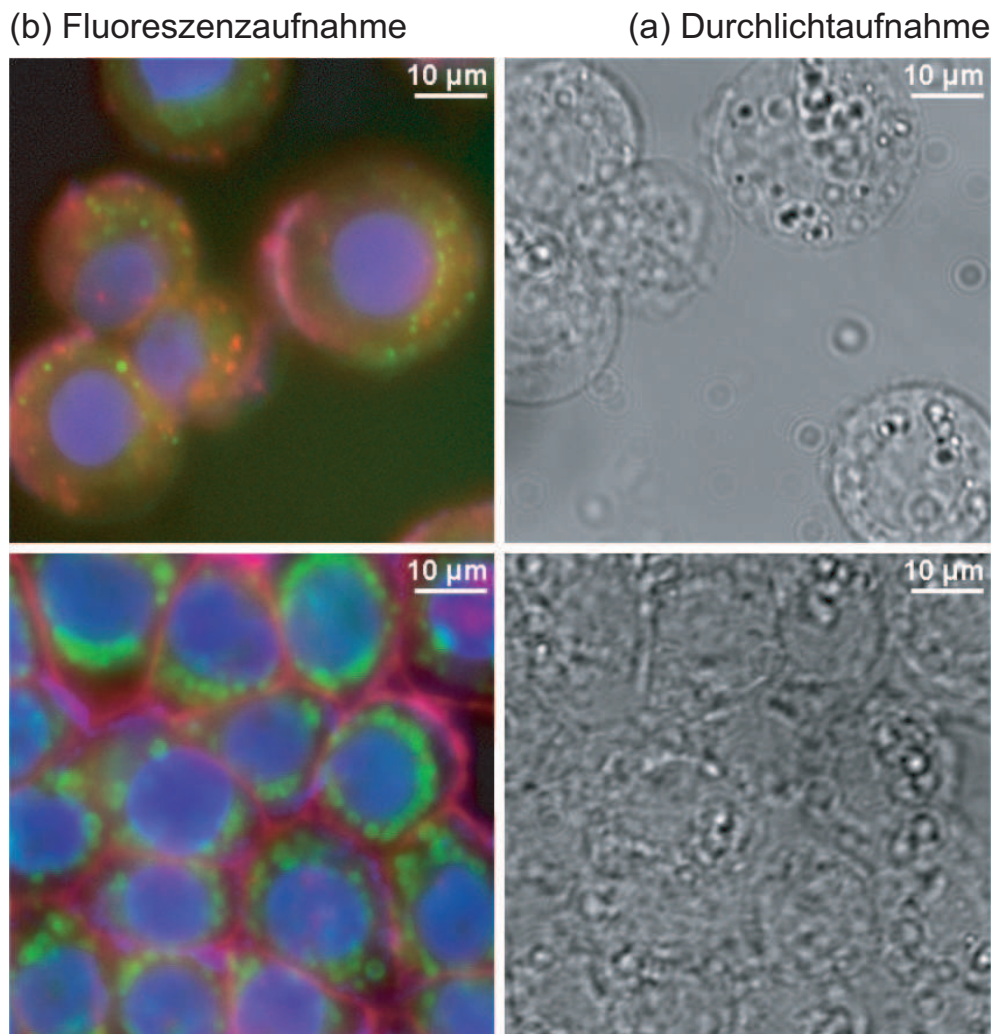


Abbildung 7.3: HT29-Zellen nach 90 min Photofrininkubation. Links: Fluoreszenzaufnahme (blau: H33342, rot: Photofrin). Rechts: Durchlichtaufnahme. Zusätzlich oben LysoTrackerGreen und unten Rhodamin 6G, beide grün.

Hierbei wurde die Lokalisation von Photofrin in der Zellmembran bestätigt und eine Unabhängigkeit der Lokalisation von der Photofrinkonzentration gezeigt.

In Abbildung 7.4 sind analog zu vorher die Fluoreszenzaufnahmen (a) und Durchlichtaufnahmen (b) von HT29-Zellen zu sehen die mit 5 µg/ml Photofrin inkubiert wurden, jetzt allerdings 24 Stunden. Als Marker wurden wieder zusätzlich der Farbstoff Hoechst 33342 (Zellkern), LysoTrackerGreen (nur oben, Lysosome) und Rhodamin 6G (nur unten, Mitochondrien) verwendet. Die Lokalisation von Photofrin nach 24 Stunden Inkubationszeit ist zwar nicht exakt am selben Ort wie der Markerfarbstoff, jedoch ist aufgrund der Orangefärbung bei den Aufnahmen mit Rhodamin 6G sowie der Verteilung, Form und Größe der roten Bildstellen davon auszugehen, dass

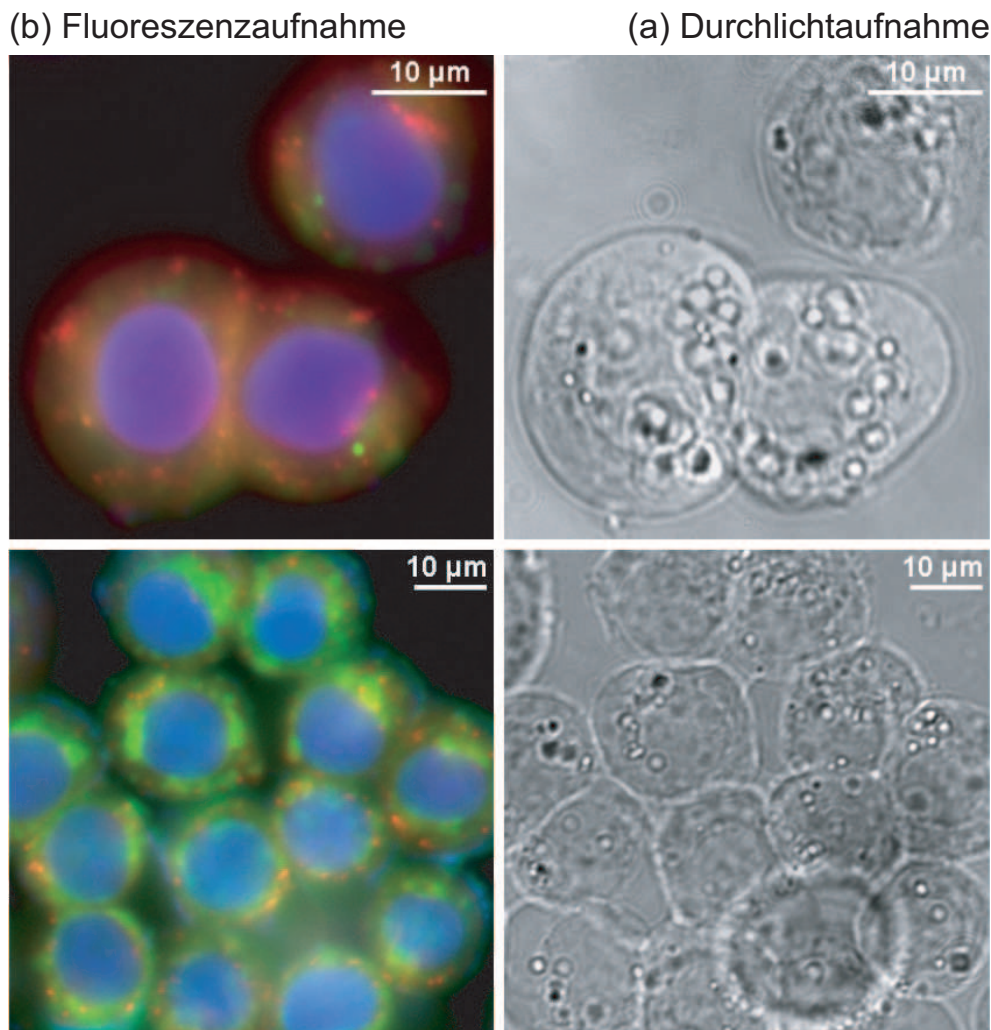


Abbildung 7.4: HT29-Zellen nach 24 h Photofrininkubation. Links: Fluoreszenzaufnahme (blau: H33342, rot: Photofrin). Rechts: Durchlichtaufnahme. Zusätzlich oben LysoTracker-Green und unten Rhodamin 6G, beide grün.

Photofrin sich innerhalb der Zelle in den Mitochondrien ansammelt. In der Arbeit von Roland Engl [E03] wurde ebenfalls für 24 Stunden Photofrin-Inkubationszeit (5 µg/l, 20 µg/l und 50 µg/l) der Ort in den Mitochondrien und eine konzentrations-unabhängige Lokalisation nachgewiesen. In der Literatur wurde bereits im Fall Photofrin gezeigt, dass dieses eine generelle Affinität gegenüber zellulären Membranen besitzt [WO97], so dass Photofrin bei einer Inkubationszeit von 24 Stunden insbesondere in den Membranen der Mitochondrien lokalisiert sein dürfte.

In Abbildung 7.5 sind HT29-Zellen in Fluoreszenzaufnahmen (a) und Durchlichtaufnahmen (b) zu sehen, die für 24 Stunden mit 200 nM ATMPn inkubiert wurden. Als Marker wurden diesmal zusätzlich der Farbstoff LysoTrackerGreen (oben, Lysosome) und Rhodamin 6G (unten, Mitochondrien) verwendet. Bisher wurde vermutet,

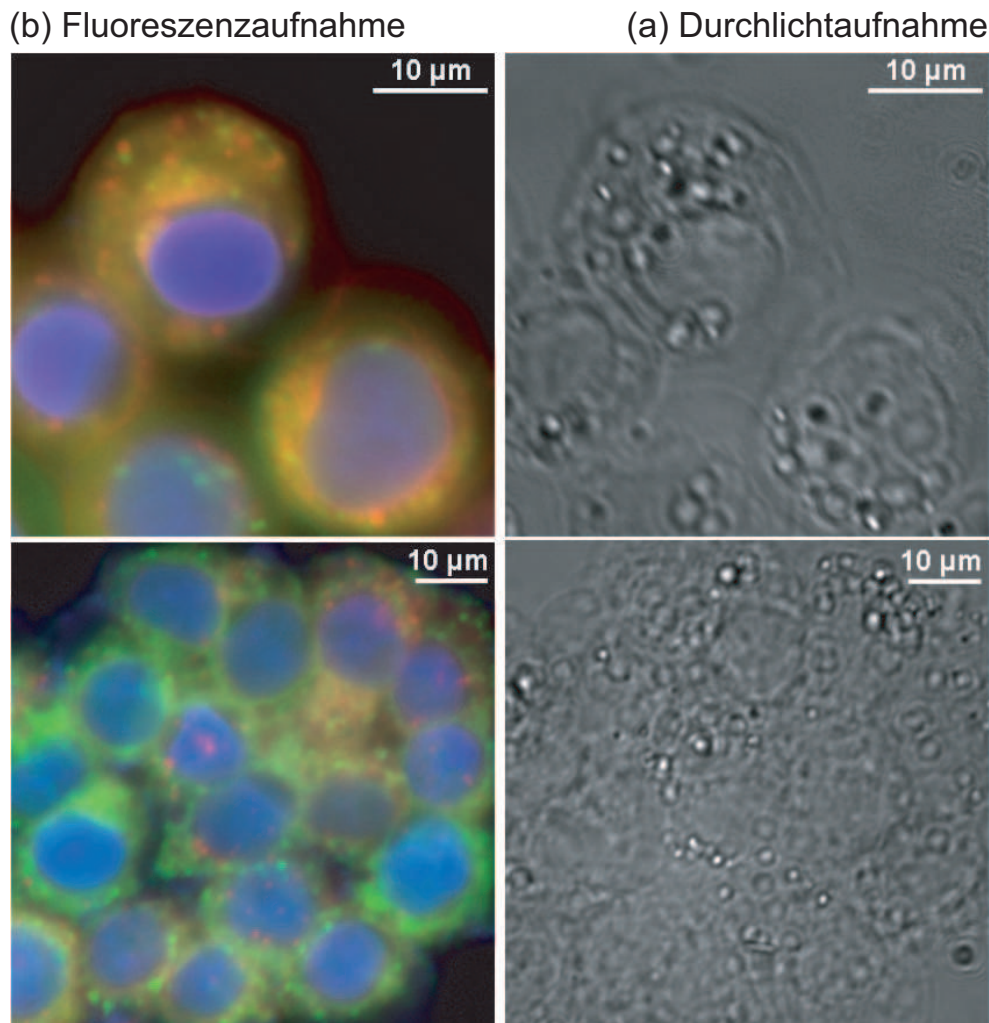


Abbildung 7.5: HT29-Zellen nach 24 h ATMPn-Inkubation. Links: Fluoreszenzaufnahme (blau: H33342, rot: ATMPn). Rechts: Durchlichtaufnahme. Zusätzlich oben LysoTracker-Green und unten Rhodamin 6G, beide grün.

dass sich ATMPn in Lysosomen ansammelt [F97]. Die Überlagerung der Aufnahme der Fluoreszenz von ATMPn (rot) mit denen der Lokalisationsfarbstoffe (jeweils grün) ergibt keine eindeutige Zuordnung zu Lysosomen oder Mitochondrien, das Erscheinungsbild der hellen Punkte sowie ihre geringe Größe sprechen jedoch eher für die Lokalisation in Lysosomen (vermutlich den Membranen der Lysosomen) als für eine Lokalisation in Mitochondrien.

7.3 Lumineszenzmessung

Für die Lumineszenzmessungen wurden die Zellsuspensionen in die Küvette des Versuchsaufbaues aus Abschnitt 4.1 gefüllt. Die Anregung des Systems Zellsuspension mit Photosensibilisator erfolgte etwa ein bis zwei Stunden nach dem Ablösen der Zellen vom Kulturflaschenboden. Die Pulsenergie zur optischen Anregung von Photofrin bzw. ATMPn in Zellsuspensionen betrug $90 \mu\text{J}$ je Puls (mittlere Leistung von 160 mW bei $1,77 \text{ kHz}$) bei einer Laserwellenlänge von 532 nm . Um das Signal-Rausch-Verhältnis zu verbessern, wurden mehrere Einzelmessungen addiert, wobei bei jeder Messung eine frische Suspension verwendet wurde.

Suspensionen von $8 \cdot 10^6$ inkubierten HT29-Zellen pro Milliliter phosphatgepufferter, physiologischer Salzlösung und einer definierten Quencher-Konzentration wurden unter Verwendung einer Suspension mit der doppelten Konzentration an inkubiertem HT29 und der Zugabe einer Lösung mit der doppelten der gewünschten Quencher-Konzentration in H_2O -PBS im Verhältnis 1:1 hergestellt. Die Zeitdauer zwischen dem Mischen der Zellsuspension mit der Quencherlösung und der anschließenden Messung der Singulett-Sauerstoff-Lumineszenz betrug eine Minute.

In Abbildung 7.6 ist das Singulett-Sauerstoff-Lumineszenzsignal, ausgehend von einer HT29-Suspension mit Photofrin, dargestellt. In Fall (a) wurden die Zellen für 90 Minuten mit $50 \mu\text{g/ml}$ Photofrin inkubiert. Es wurden dabei acht Messungen mit jeweils $1 \cdot 10^4$ Schuss summiert, um ein besseres Signal-Rausch-Verhältnis zu erreichen. Laut Abschnitt 7.2 lokalisiert das Photofrin, bei einer Inkubationszeit von 90 Minuten, hauptsächlich in der Zellmembran. Das bedeutet aber auch, dass der Entstehungsort des Singulett-Sauerstoff ebenfalls dort ist. Die Lebensdauer des Singulett-Sauerstoff kann in diesem Fall aus Abbildung 7.6 (a) zu $\tau_2 = (10 \pm 3) \mu\text{s}$ bestimmt werden.

Das Singulett-Sauerstoff-Lumineszenzsignal von HT29-Zellen, die 24 Stunden mit $50 \mu\text{g/ml}$ Photofrin inkubiert wurden, ist in Bild 7.6 (b) zu sehen. Dabei wurden Messungen mit fünf frischen Proben mit jeweils $2 \cdot 10^4$ Schuss summiert. Das inkubierte Photofrin ist nun hauptsächlich in den Membranen der Mitochondrien lokalisiert. Es ergibt sich eine Singulett-Sauerstoff-Lebensdauer von $\tau_2 = (11 \pm 3) \mu\text{s}$. Im Rahmen der Messgenauigkeit ist kein wesentlicher Unterschied zum 90-Minuten-Fall zu sehen. Photofrin lagert sich in Zellen hauptsächlich in den Membranen an. Bei 90 Minuten Inkubationszeit in der äußeren Zellmembran und bei 24 Stunden Inkubationszeit in den Zellmembranen der Mitochondrien (vgl. Abschnitt 7.2). Die Zellmembranen bestehen hauptsächlich aus Lipiden und darin eingebetteten Proteinen. Durch die Bestrahlung der Zellen mit Laserlicht bei 532 nm wird durch Photofrin Singulett-

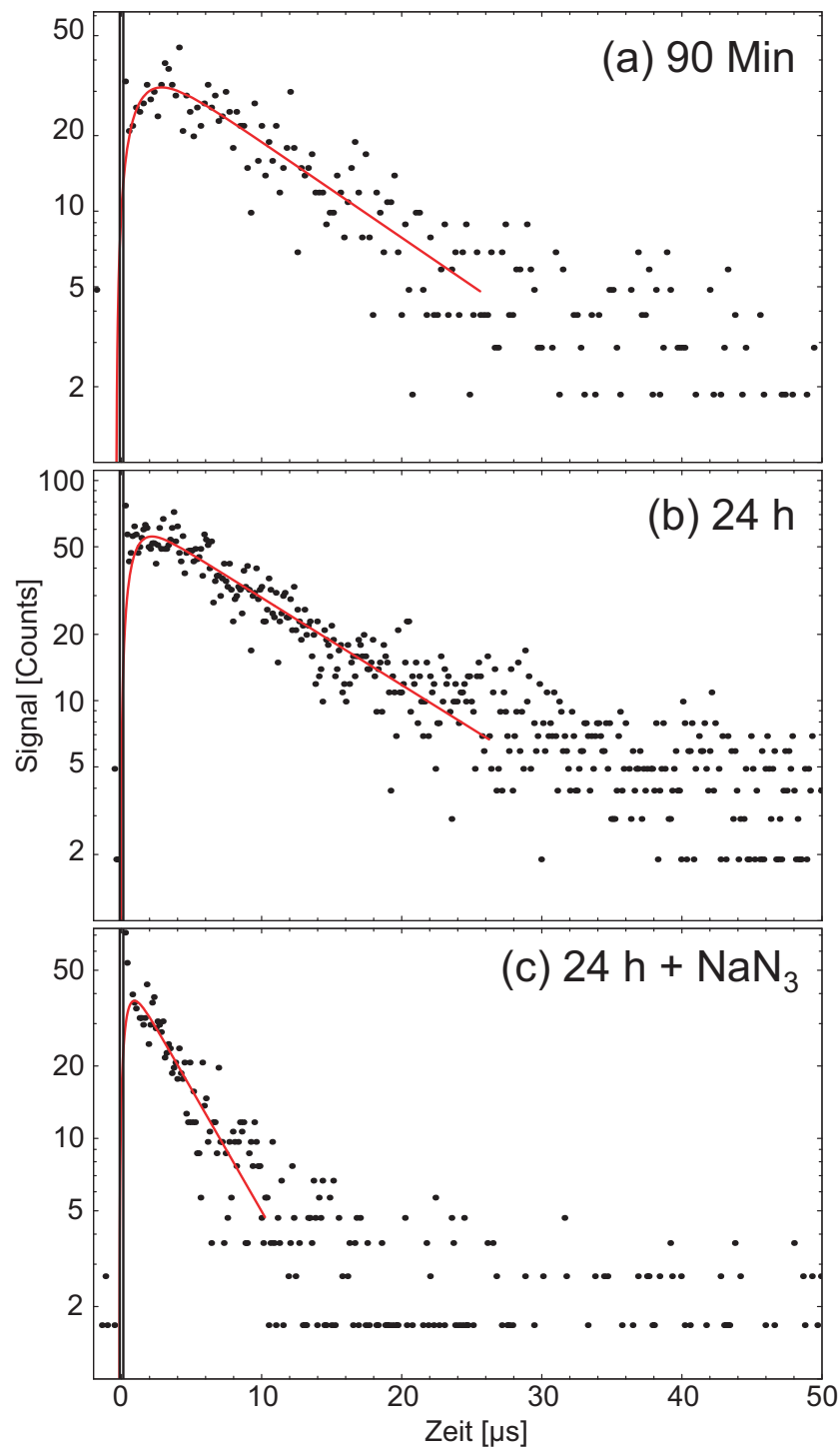


Abbildung 7.6: Singulett-Sauerstoff-Lumineszenzsignal generiert in HT29-Zellen durch 50 $\mu\text{g/ml}$ Photofrin (a) inkubiert für 90 Minuten (b) inkubiert für 24 Stunden und (c) Zugabe von 50 mM NaN_3 .

Sauerstoff in den Zellmembranen generiert. Anschließend kann Singulett-Sauerstoff innerhalb seiner Lebensdauer durch die Zelle diffundieren. Die Diffusionslänge lässt

sich bei einer Lebensdauer von $\tau = 10 \mu\text{s}$ und der Diffusionskonstante von Zellmembran und Zytoplasma (vgl. Abschnitt 6.2.1) zu $l = 0,3 \mu\text{m}$ nach Gleichung (6.1) abschätzen. Die Zelle hat einen Durchmesser von etwa $10 \mu\text{m}$. Folglich bleibt der diffundierende Singulett-Sauerstoff, generiert in den Membranen der Mitochondrien, hauptsächlich in der Zellen. Der Singulett-Sauerstoff, der in der äußeren Zellmembran generiert wurde, hat die Möglichkeit in die Zelle (Zytoplasma) oder in das zellumgebende Wasser zu diffundieren. Das bedeutet, dass der Singulett-Sauerstoff mit verschiedenen Umgebungen in Berührung kommt, die unterschiedliche Lebensdauern für Singulett-Sauerstoff bewirken, $(15 \pm 3) \mu\text{s}$ in Lipid, $(3,5 \pm 0,5) \mu\text{s}$ in H_2O und weniger als $0,5 \mu\text{s}$ in Protein. Dies hat zur Folge, dass die mittlere Lebensdauer von Singulett-Sauerstoff, die unser System detektiert, im Gesamtsystem eine Zwischenzeit ist, die zwischen der längsten (hier Lipidzeit) und der kürzesten Zeit (hier Proteinzeit) liegt. Es lässt sich natürlich nicht auszuschließen, dass andere Bereiche mit unbekannten Singulett-Sauerstoff-Lebensdauern diese Zwischenzeit ebenfalls beeinflussen. Als Ergebnis bleibt, dass das von uns detektierte Lumineszenzsignal eine Lebensdauer von $(10 \pm 3) \mu\text{s}$ und $(11 \pm 3) \mu\text{s}$ hat. Die Lebensdauer ist somit etwas kürzer als die vom Lipid und deutlich länger als die vom Wasser. Die Lumineszenz muss also aus der Zelle stammen und kann nicht vom umgebenden Wasser herrühren. Die relativ lange Zeit spricht sogar dafür, dass der Singulett-Sauerstoff sich wahrscheinlich hauptsächlich im Lipid aufhält.

In Abbildung 7.6 (c) wurden die Zellen ebenfalls für 24 Stunden mit $50 \mu\text{g/ml}$ Photofrin inkubiert. Es wurde aber kurz vor der Lumineszenzmessung noch 50 mM Natriumazid hinzugegeben. Die gemessene Lebensdauer von Singulett-Sauerstoff beträgt in diesem Fall $\tau_2 = (4 \pm 2) \mu\text{s}$. Es ist also eine deutliche Verkürzung sichtbar. Natriumazid, als kleines polares Molekül, wird durch die Zellmembran sehr schnell aktiv von den Zellen aufgenommen [TCL03]. Deshalb kann man annehmen, dass Singulett-Sauerstoff in Kontakt mit dem Natriumazid kommt und dieses, als Quencher, die Lebensdauer von Singulett-Sauerstoff verkürzt. Somit kann ein Nachweis, dass es sich um die Lumineszenz von Singulett-Sauerstoff handelt, erbracht werden. Als zweiter Photosensibilisator wurde ATMPn verwendet und in HT29-Zellen eingebracht. Photofrin löst sich gut in Wasser und in Lipid. Es ist also nicht auszuschließen, dass Photofrin aus der Zelle ins Wasser diffundiert und dort Singulett-Sauerstoff generiert. ATMPn hingegen löst sich nicht in Wasser und befindet sich somit ausschließlich in den Zellen. Hinzu kommt, dass ATMPn eine Reinsubstanz ist und kein Gemisch wie Photofrin.

Abbildung 7.7 zeigt die für diesen Fall gemessenen Lumineszenzsignale. In Messung (a) wurden HT29-Zellen für 24 Stunden mit $50 \mu\text{M}$ ATMPn inkubiert. Der

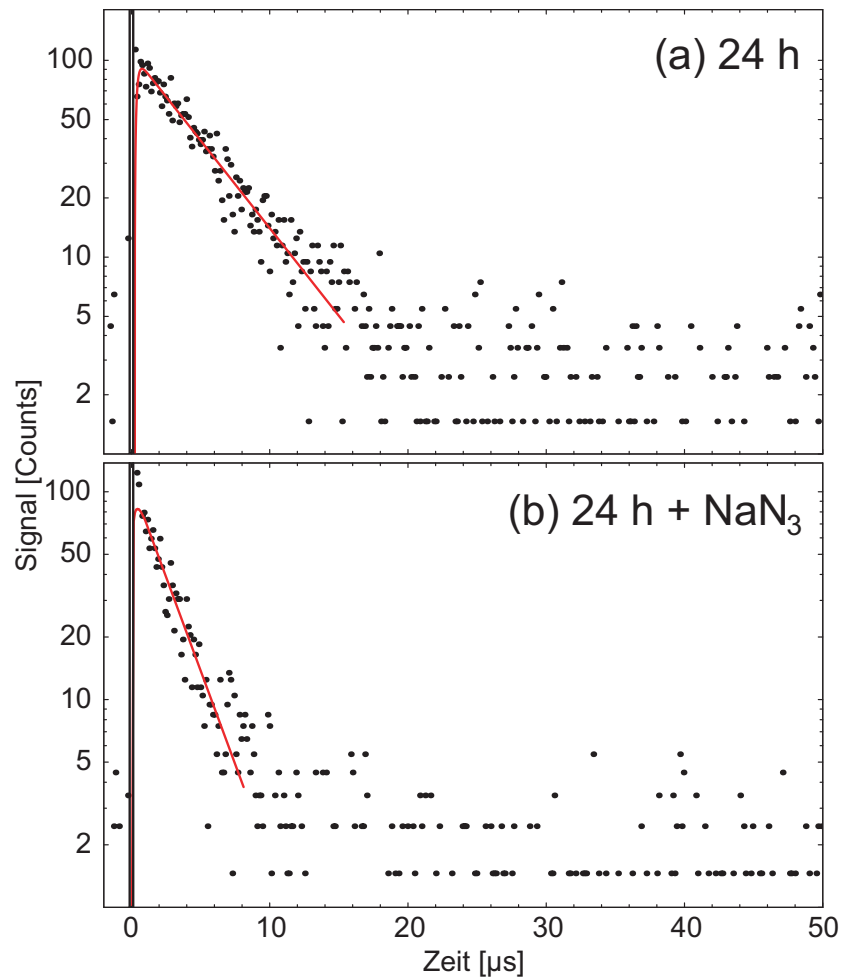


Abbildung 7.7: Singulett-Sauerstoff-Lumineszenzsignal generiert in HT29-Zellen durch 50 μM ATMPn (a) inkubiert für 24 Stunden und (b) zusätzliche Zugabe von 50 mM NaN_3 .

Farbstoff sollte in den Lysosomen der Zelle lokalisiert sein (vgl. Abschnitt 7.2). Hierbei wurden fünf Proben mit jeweils $4 \cdot 10^4$ Schuss summiert, um ein besseres Signal-Rausch-Verhältnis zu erreichen. Die Lebensdauer des Singulett-Sauerstoff beträgt hier $\tau_2 = (6 \pm 2) \mu\text{s}$ und ist somit deutlich kürzer als die Lebensdauer des Singulett-Sauerstoff, der von Photofrin in HT29-Zellen erzeugt wurde. Dieser Unterschied kann verschiedene Gründe haben. Eine mögliche Ursache ist sicher die unterschiedliche Lokalisation der Farbstoffe und somit die unterschiedliche Umgebung, in der sich der angeregte Sauerstoff befindet. Photofrin befindet sich in den Membranen der Zellwand und der Mitochondrien, ATMPn in den Membranen der Lysosomen. All diese Membranen sind mit Proteinen durchdrungen. Doch leider ist die Anzahl und die Art der Proteine in den unterschiedlichen Membranen nicht bekannt. Es können somit entweder einfach nur mehr Proteine in der Membran der Lysosomen vorhanden sein oder aber stärker quenchende. Dies würde dann zu einer

stärker quencheden Umgebung für Singulett-Sauerstoff führen und deshalb eine kürzere Lebensdauer bedeuten. Ein weiterer Grund könnte die nicht bekannte Konzentration des Photosensibilisators vor Ort sein. Es ist lediglich bekannt, mit welcher Konzentration die Zellen inkubiert wurden. Nicht bekannt ist, wieviel Farbstoff die Zellen aufnehmen und wieviel Farbstoff dann lokal vorhanden ist. Hohe Farbstoffkonzentrationen können ebenfalls die Lebensdauer von Singulett-Sauerstoff durch Quenchen verkürzen.

Die Zugabe von 50 mM Natriumazid (Bild 7.7 (b)) zu HT29-Zellen mit 50 μ M ATMPn (24 Stunden inkubiert) führt zu einer Verkürzung der Lebensdauer von Singulett-Sauerstoff zu $\tau_2 = (2,5 \pm 1,0) \mu$ s. Der Nachweis für Singulett-Sauerstoff, durch Verwendung von Natriumazid, kann also auch hier erbracht werden.

7.4 Zellvitalität

Da Photofrin und ATMPn selbst eine gewisse Dunkeltoxizität besitzen, und die Produktion von Singulett-Sauerstoff mit der oxidativen Schädigung von zellulären Bestandteilen einhergeht, wurde im Anschluss an die Messung der Singulett-Sauerstoff-Lumineszenz die Zellvitalität, d.h. das Verhältnis von lebenden Zellen zur Gesamtzahl an Zellen in einer bestrahlten Suspension, bestimmt, um zu zeigen, dass die gemessene Singulett-Sauerstoff-Lumineszenz von Singulett-Sauerstoff stammt, der in intakten und nicht in toten Zellen generiert wurde. Hierzu wurde die Trypan-Blau-Färbung verwendet. Trypan-Blau kann nicht durch die intakte Plasmamembran von lebenden Zellen hindurch ins Zellinnere gelangen. Jedoch verbraucht eine Zelle Energie, um diesen Farbstoff nicht ins Innere dringen zu lassen. Bei toten Zellen kann deshalb Trypan-Blau durchaus ins Zellinnere dringen, so dass sich tote Zellen blau anfärben lassen. Für die Durchführung der Trypan-Blau-Färbung wurde der jeweiligen bestrahlten Zellsuspension mit noch unbestimmter Zellvitalität Trypan-Blau im Verhältnis 2:1 zugegeben. Das Verhältnis von lebenden, d.h. nicht blau angefärbten Zellen zur Gesamtzahl an gezählten Zellen wurde unter Verwendung eines Lichtmikroskops und einer Neubauer-Zählkammer bestimmt.

In Tabelle 7.1 sind die Ergebnisse am Beispiel von Photofrin in HT29-Zellen bei 90 Minuten Inkubation zusammengefasst. In den ersten vier Zeilen der dritten Spalte ist zu sehen, dass die Fähigkeit des Photosensibilisators Photofrin, die HT29-Zellen zu töten, ohne die Bestrahlung von Licht (Dunkeltoxizität), mit der Konzentration an Photofrin ansteigt. Bei 0 μ g/ml Photofrin, also HT29-Zellen ohne Photosensibi-

Photofrin [$\mu\text{g/ml}$]	Quencher [50mM]	Zellvitalität unbestrahlt	Zellvitalität bestrahlt
0	-	0,98	0,85
5	-	0,76	0,72
20	-	0,61	0,66
50	-	0,50	0,33
50	NaN_3	0,52	0,54

Tabelle 7.1: Die Zellvitalität (Verhältnis von lebenden Zellen zur Gesamtzahl an Zellen) von HT29-Zellen die 90 Minuten mit Photofrin inkubiert wurden. Es ist ein Fehler von 20 % anzunehmen.

lisor, leben 98 % der Zellen, während bei steigender Photofrinkonzentration die Anzahl der lebenden Zellen bis auf 50 %, bei 50 $\mu\text{g/ml}$ Photofrin, sinkt. Während des Lumineszenzexperimentes (Umfüllen der Lösung und Bestrahlung durch den Laser) werden gegenüber den unbestrahlten Zellen (dritte Spalte) ein Teil der Zellen (vierte Spalte) abgetötet. Ohne Photosensibilisator überleben 85 % von ehemals 98 %. Dies führt sich fort bis zur höchsten Konzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$ Photofrin. Hier überleben 33 % der HT29-Zellen von ehemals 50 % lebenden Zellen. Es ist also deutlich zu sehen, dass Singulett-Sauerstoff Zellen töten kann. Der Anteil der überlebenden Zellen fällt dabei mit der steigenden Photofrin-Konzentration.

Wie zu erkennen ist (letzte Zeile), lässt sich durch die Zugabe von Natriumazid, über eine Verkürzung der Singulett-Sauerstoff-Lebensdauer (siehe Abschnitt 7.3), die Zellvitalität der laserbestrahlten Zellen innerhalb der Messgenauigkeit auf den Wert der unbestrahlten heben. Der Quencher deaktiviert den angeregten Sauerstoff, bevor er zelltoxisch wirken kann. Dieses Verfahren wird als indirekte Nachweismethode des Singulett-Sauerstoffs im Rahmen von Zellkulturexperimenten, wie sie hier dargestellt werden, angewandt.

Kapitel 8

Singulett-Sauerstoff in bakterieller Umgebung

Bakterielle Infektionen werden in der Regel mit Antibiotika bekämpft. Mittlerweile haben sich aber auch Antibiotika resistente Bakterien entwickelt. Von besonderer Bedeutung sind dabei resistente *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) Bakterien, welche durch Unsauberkeit im Krankenhaus erworben werden können, die so genannten MRSA (Methicillin-resistenter *Staphylococcus aureus*). Kürzlich veröffentlichte Studien [SMB03] zeigen, dass von 100 % beobachteten *S.-aureus*-Stämmen im Jahr 2000 28 % resistent gegen Methicillin waren und somit zur MRSA-Kategorie gehören. 1986 waren es nur 13 %. Dieser starke Anstieg zeigt, dass die Gefahr durch resistente Bakterien stetig wächst und andere Methoden zur Bekämpfung gefunden werden müssen. Als Alternative bietet sich, analog zur PDT, eine photodynamische Deaktivierung der Bakterien mit Hilfe von reaktiven Sauerstoffspezies, wie Singulett-Sauerstoff, an. In neuesten Untersuchungen ist es bereits gelungen, sowohl resistente [SFB02] als auch nicht-resistente Bakterien [MBS05] auf diese Weise abzutöten.

Bisher konnte die Beteiligung von Singulett-Sauerstoff aber nur indirekt über chemische Reaktionen und Quencher nachgewiesen werden [K86]. Diese indirekten Methoden liefern jedoch keinerlei genauere Erkenntnisse über Mechanismus und Ort der Erzeugung bzw. die Lebensdauer von Singulett-Sauerstoff in Bakterien. Im Folgenden wollen wir mit Hilfe der direkten Detektion von Singulett-Sauerstoff über seine Lumineszenz genauere Informationen zur photodynamischen Deaktivierung von Bakterien erhalten. Insbesondere *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) und *Escherichia coli* (*E. coli*, Kolibakterium) werden dabei untersucht.

8.1 Material und Methoden

Zuerst soll der Aufbau eines Bakteriums, sowie der Prozess der Herstellung einer Bakterien-Suspension, behandelt werden.

8.1.1 Aufbau eines Bakteriums

Die Bakterien gehören zu den prokaryotischen Zellen und sind wesentlich einfacher aufgebaut als die eukaryotischen Zellen (z.B. HT29-Zelle). In Abbildung 8.1 ist der schematische Aufbau eines Bakteriums gezeigt. Die DNA befindet sich in den

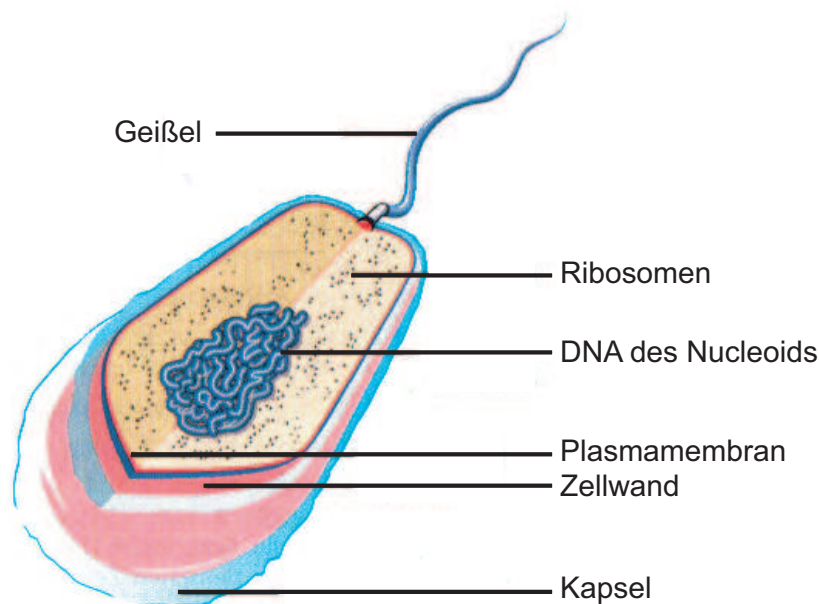


Abbildung 8.1: Die Struktur einer prokaryotischen Zelle bzw. eines Bakteriums. Quelle: [K05]

prokaryotischen Zellen frei im Cytoplasma als Kernäquivalent oder auch Nucleoid. Außerdem sind prokaryotische Zellen nicht kompartmentiert und enthalten keine Organellen wie Chloroplasten, Mitochondrien, Golgi-Apparat, Vakuolen und endoplasmatisches Retikulum (vgl. Abbildung 7.1 und Abschnitt 7.1.1). Nur Ribosomen sind im Cytoplasma vorhanden. Die Plasmamembran ist ähnlich aufgebaut wie die der eukaryotischen Zellen und fungiert auch hier als selektiv-permeable Trennwand zwischen der lebenden und der unbelebten Welt. Die Bakterien können zusätzlich noch von einer starren, abgestorbenen Zellwand umgeben sein, welche die empfindliche Lebensform im Inneren schützt. Weiter kann eine Kapsel als zusätzlicher

Schutz vorhanden sein. Ihre Dicke kann je nach Stamm variieren und sie kann bei allen Gram-positiven sowie Gram-negativen (Gram-Färbung, siehe weiter unten) Bakterien vorkommen. Man kann daher bei dünneren Schichten von einer Schleimhülle und bei dickeren Schichten von einer Kapsel sprechen. Oft sind diese Schichten sogar dicker als das Bakterium selbst. Die Kapsel setzt sich aus Zuckern zusammen die an UDP (organische Moleküle, die aus einer Base und einer Pentose bestehen) gebunden sind. Die bakterielle Geißel oder Flagelle ist ein extrazellulärer Faden, der mit einem Motorkomplex in der Zellmembran (bzw. den Zellmembranen) und der Zellwand verankert ist. Die Geißel dient der Fortbewegung und besteht vollständig aus Proteinen. Der Motorkomplex setzt einen Konzentrationsunterschied von Protonen zwischen den beiden Seiten der inneren Zellmembran in eine Drehbewegung des auf einem gekrümmten Haken sitzenden Filamentes (Fadens) um.

Die Gram-Färbung ist eine Methode zur Einfärbung der Zellwand von Bakterien, so dass diese unter dem Mikroskop differenziert erscheinen. Die Gram-Färbung ist nach dem dänischen Arzt und Bakteriologen Hans Christian Gram benannt, der sie ca. Ende des 19. Jahrhunderts entwickelte. Verschiedene Bakterien reagieren auf diese Färbung unterschiedlich. Daraus folgt eine Einteilung in sog. Gram-positive Bakterien, die violett/blau erscheinen, und Gram-negative Bakterien, die rot gefärbt werden. Dies ist ein wichtiges Kriterium für die Unterscheidung verschiedener Bakterien, z.B. bei der Diagnostik von Infektionskrankheiten. Gram-positive und Gram-negative Bakterien reagieren unterschiedlich auf Antibiotika. Mit dieser schnellen diagnostischen Methode kann man in kurzer Zeit (ca. 5 Minuten) anhand eines Abstrichs das Gram-Verhalten der Bakterien bestimmen. Damit hat man die Möglichkeit, sofort mit einer antibiotischen Therapie zu beginnen, bevor das Ergebnis der, oft mehrere Tage dauernden, definitiven Keimbestimmung vorliegt.

In dieser Arbeit werden sowohl Gram-positive als auch Gram-negative Bakterien untersucht. *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) sind kugelförmige, Gram-positive Bakterien, die häufig in Trauben angeordnet sind. Sie sind unbeweglich und bilden keine Sporen. Die Größe des Bakteriums liegt üblicherweise zwischen 0,8 und 1,2 μm . Die Koagulase-positive¹ Staphylokokken-Spezies *Staphylococcus aureus* zählt zu den wichtigsten Erregern im Krankenhaus erworbener Infektionen. Der Erreger ist äußerst widerstandsfähig gegen Einflüsse wie Austrocknung und kann eine Reihe von Resistenzen gegenüber Antibiotika aufweisen.

In Abbildung 8.2 (a) ist die umgebende Membran der Gram-positiven Bakterien

¹In der Mikrobiologie dient die Koagulase-Reaktion dem Nachweis des Clumping-Faktors, einem Protein von *Staphylococcus aureus*. Wichtig ist dies, um *S. aureus* von anderen Staphylokokken zu unterscheiden.

schematisch dargestellt. Als Basis dient, wie bei den eukaryotischen Zellen, die

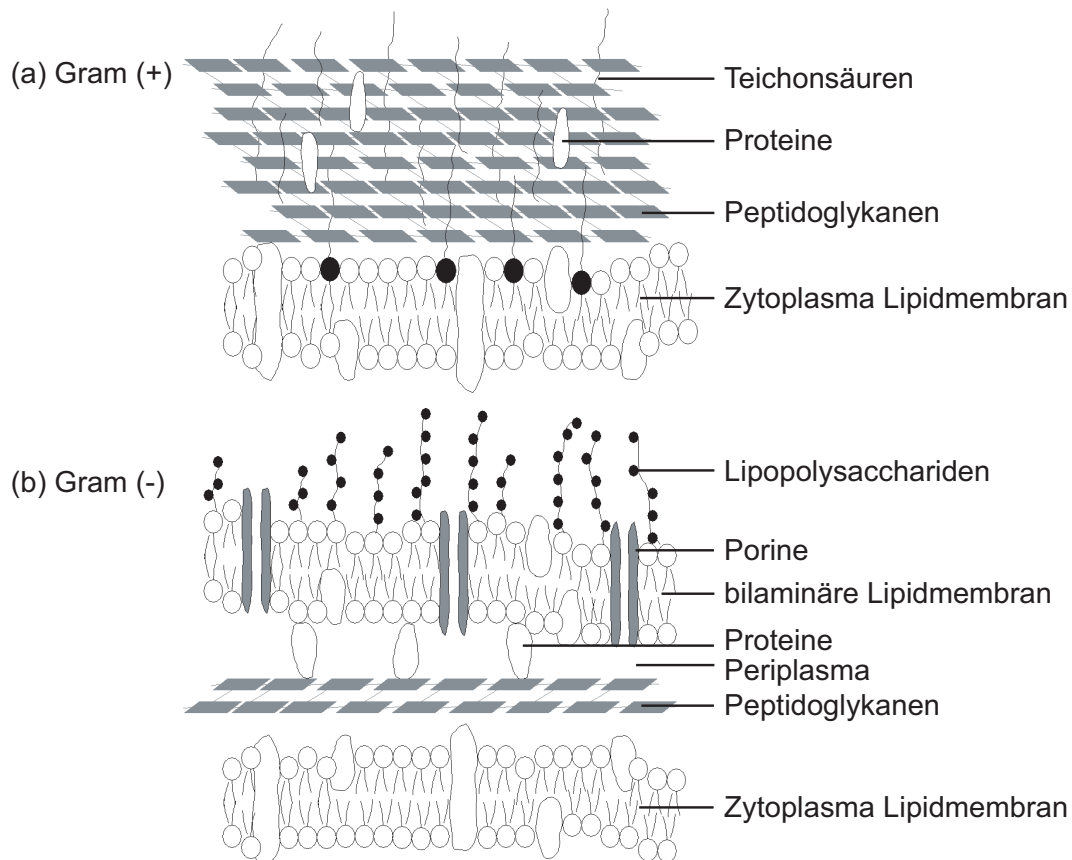


Abbildung 8.2: Schematischer Aufbau der die Bakterien umgebenden Zellwand von (a) Gram-positiven und (b) Gram-negativen Bakterien. Quelle: [MSJ04].

Plasmamembran aus einer Lipiddoppelschicht, die das Zytoplasma einschließt. In dieser inneren Membran werden Proteine ein- und angelagert, die unterschiedlich weit in sie hinein- oder sogar durch sie hindurch reichen. Gram(+) Bakterien besitzen zusätzlich eine etwa 15 – 80 nm dicke Zellwand, bestehend aus bis zu 100 Schichten von Peptidoglykanen (Zucker-Eiweiß-Moleküle), in welche Teichonsäuren, mit und ohne Lipidanteil, vernetzt sind. Proteine sind mit in die Peptidoglykanschichten eingebettet.

Das Colibakterium (*E. coli*) ist ein säurebildendes, Gram-negatives, stäbchenförmiges und begeißeltes Bakterium, das im menschlichen und tierischen Darm vorkommt und wichtige Funktionen im Immunsystem hat. Es gehört zur Familie der Enterobacteriaceae (lat. enteron: Darm). Weiter gehört es zu den fakultativ anaeroben Mikroorganismen und besitzt die Fähigkeit, Energie sowohl durch Atmung als auch durch gemischte Säuregärung zu gewinnen. Es dient als Indikator für fäkale Verunreinigungen, beispielsweise von Wasser. Es veranlasst ein dauerndes Training des

Mukosa-Immunsystems und fördert die Produktion von sekretorischem Immunglobulin A. Weiterhin produziert es Vitamin K. In Abbildung 8.2 (b) ist die umgebende Membran der Gram-negativen Bakterien schematisch dargestellt. Neben der Plasmamembran besitzen diese Bakterien auch eine Zellwand, welche hier zwischen 10 und 15 nm dick ist. *E. coli* besitzt eine dünne, innere Zellwand bestehend aus 2 - 3 Schichten von Peptidoglykanen, einem periplasmatischen Raum und eine äußere bilaminäre Lipidmembran. Die äußere Doppelmembran besteht auf der Innenseite aus Phospholipiden, die über Lipoproteine mit der angrenzenden bilaminären Lipidmembran verbunden sind. Die Außenseite besteht aus Lipopolysacchariden (LPS) und Porinen (Tunnelproteine).

8.1.2 Erstellung der Bakteriensuspension

Zur Herstellung der Bakteriensuspension wurden *S. aureus* (ATCC 25923, Gram-positive Bakterien) und *E. coli* (ATCC 25922, Gram-negative Bakterien) in gleicher Weise behandelt, unter Verwendung von Photofrin als medizinisch zugelassenem Photosensibilisator. Die Bakterienstämme wuchsen sauerstoffabhängig an der Klinik und Poliklinik für Dermatologie der Universität Regensburg bei 37 °C in einer infusionsartigen Fleischbrühe (BHI) aus Herz und Hirn (Gibco Life Technologies GmbH, Eggenstein, Deutschland) heran. Aus einem so über Nacht herangewachsenen Bakterienstamm (3 ml) werden dann 500 µl in 50 ml neue BHI-Lösung eingebracht. Bei 37 °C unter ständigem Schütteln, zur Gewährleistung einer guten Sauerstoffzufuhr, erfolgt ein weiteres Wachsen des Bakterienstamms. Nachdem die Bakterien die stationäre Phase (kein weiteres Wachstum) erreicht haben, wird die Bakteriensuspension in eine Zentrifuge eingebracht. Bei 200 g für 15 Minuten setzen sich die Bakterien ab und der Überstand wird abgesaugt. Mit einer 10 mM phosphatgepufferten, physiologischen Salzlösung (PBS), bestehend aus 2,7 mM KCl und 0,14 M NaCl (Biochrom, Berlin) in H₂O und einem pH-Wert von 7,4, werden die Bakterien gespült. Anschließend werden die Bakterien in PBS suspendiert bis bei 650 nm eine optische Dichte von 0,7 erreicht wird. Diese optische Dichte entspricht dann etwa 10⁸ Bakterien pro Milliliter.

Um ein reproduzierbares genaueres Maß für die Anzahl der Bakterien pro Milliliter zu erhalten, wurde bei den Proben für die Lumineszenzmessungen die BCA-Methode zur Konzentrationsbestimmung gewählt. Dabei handelt es sich um einen sehr empfindlichen Proteinnachweis. Durch Einbringen von Cu²⁺-Ionen bildet sich

ein Cu-Protein-Komplex aus, der optisch nachgewiesen werden kann. Bei 540 nm wird dann die optische Dichte der Suspension bestimmt und mit einer Eichkurve verglichen. Daraus lässt sich anschließend die Anzahl der Proteine in mg/ml bestimmen. Die Anzahl der Bakterien ist dabei proportional zur Protein-Konzentration. Zusätzlich wurden in der gleichen Weise Proben ohne Photosensibilisator hergestellt. Es soll sichergestellt werden, dass neben dem Farbstoff keine andere Substanz Singulett-Sauerstoff generiert. Erwartungsgemäß erzeugten diese Leer-Messungen bei der Anregungswellenlänge von 532 nm kein Lumineszenzsignal.

8.2 Durchlicht- und Fluoreszenzaufnahmen bei Bakteriensuspension

Aufgrund der geringen Größe der Bakterien (Bakteriendurchmesser etwa 1 μm gegenüber 1 μm Auflösung) ist es nicht möglich, wie bei den HT29-Zellen gezeigt (vgl. Abschnitt 7.2), Strukturen in den lebenden Bakterien zu erkennen oder die Lokalisation von Farbstoffen zu zeigen. Es ist aber sehr wohl möglich, zu erkennen, ob Farbstoff aufgenommen wurde oder nicht. Hierzu wurden Suspensionen von *S. aureus* und *E. coli* mit 10^6 Bakterien pro Milliliter mit 0,5 mg/ml Photofrin für 90 Minuten inkubiert. Nach drei Waschvorgängen mit destilliertem Wasser wurden die Bakterien in PBS resuspendiert. Als weiterer Farbstoff wurde Hoechst 33342 (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) verwendet, der sich im Zellkern der Bakterien anlagert. Hier wurde nur 10 Minuten inkubiert und anschließend dreimal mit destilliertem Wasser gewaschen und in PBS resuspendiert. Anschließend wurden jeweils 50 μl der Suspension auf den Objektträger vom Mikroskop aus Abschnitt 4.2 aufgebracht und für drei Stunden bei 4 °C abgekühlt, um die Mobilität der Bakterien herabzusetzen.

In Abbildung 8.3 sind die dann erhaltenen Aufnahmen des Fluoreszenzmikroskops zu sehen. Sowohl die *S. aureus* ((a), oben) als auch die *E. coli* ((b), oben) nehmen den Zellkernmarker Hoechst 33342 (blaues Leuchten in der Falschfarbendarstellung) auf. Aufgrund der Größe der Bakterien sind, wie erwartet, keine Details zu sehen, sondern nur Bakterien, die in ihrer Gesamtheit leuchten. Analog hierzu sind in Abbildung 8.3 unten Fluoreszenzbilder mit Photofrin zu sehen. Sowohl *S. aureus* ((a), unten) als auch *E. coli* ((b), unten) wurden mit Photofrin inkubiert. Die Fluoreszenz von Photofrin ist aber nur bei den *S. aureus*-Bakterien zu sehen (grünes Leuchten

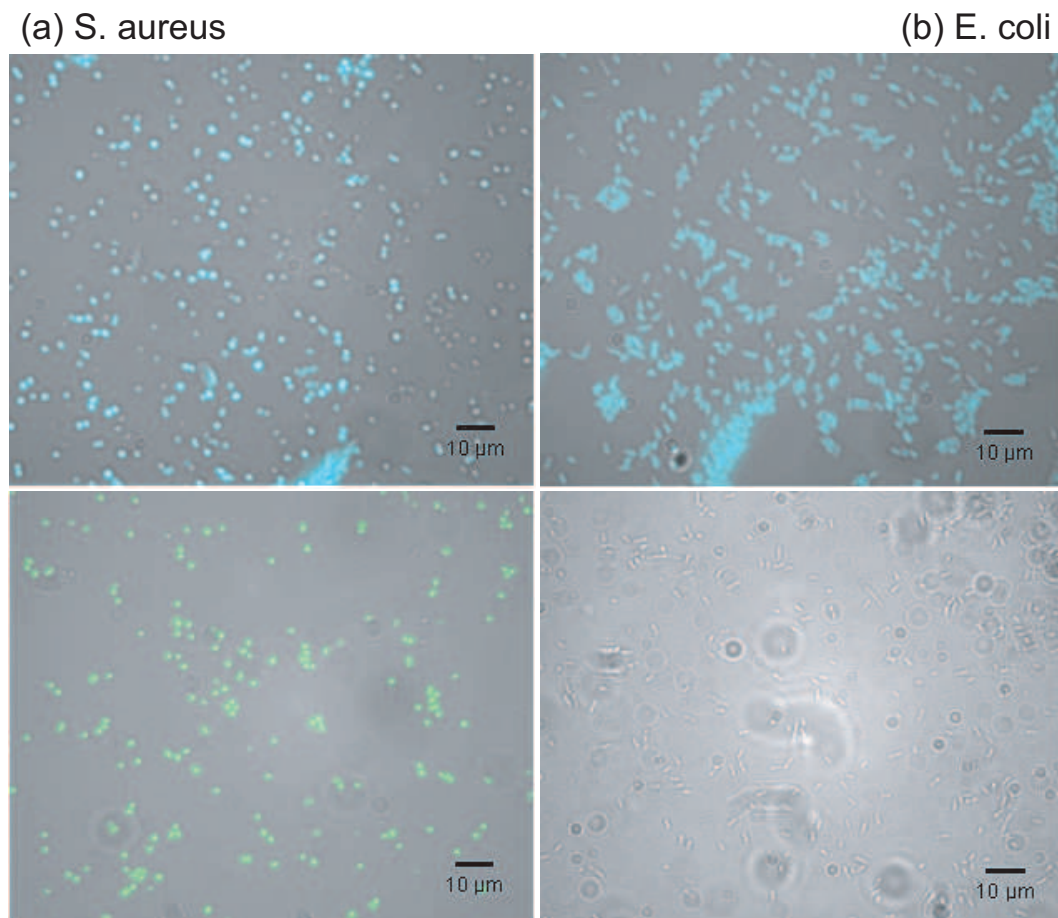


Abbildung 8.3: Fluoreszenzmikroskop-Aufnahme von (a) *S. aureus* und (b) *E. coli* in H_2O . Die oberen Suspensionen sind mit Hoechst 33342 inkubiert, die unteren mit Photofrin.

in der Falschfarbendarstellung). Die *E. coli* zeigen hingegen keine Fluoreszenz von Photofrin. Es muss wohl angenommen werden, dass, anders als beim Zellkernmarker Hoechst 33342, Photofrin nur von den *S. aureus*-Bakterien aufgenommen wird. Zusätzlich wurden mit dem Durchlichtmikroskop Aufnahmen bei unterschiedlichen Bakteriendichten gemacht. Die Bakteriendichte wurde dabei in Proteinen pro Milliliter, was proportional zur Bakteriendichte ist, bestimmt. In Abbildung 8.4 ist dies Messreihe zu sehen. Dargestellt sind *S. aureus* Bakterien in einem Tröpfchen auf dem Objektträger des Mikroskops. Bei 0,15 mg/ml Protein sind nur einzelne Bakterien zu sehen, die von Wasser umgeben sind. Bei 0,25 mg/ml Protein sind größere Gruppen von Bakterien zu sehen. Das typische traubenartige Zusammenfinden der *S. aureus* Bakterien ist hier gut zu sehen. Bei der nächsthöheren Konzentration an Proteinen (0,5 mg/ml) ist das Verklumpen noch mehr ausgeprägt. Bei 1,5 mg/ml Protein sind bereits so viele Bakterien vorhanden, dass ein fast geschlossener Teppich

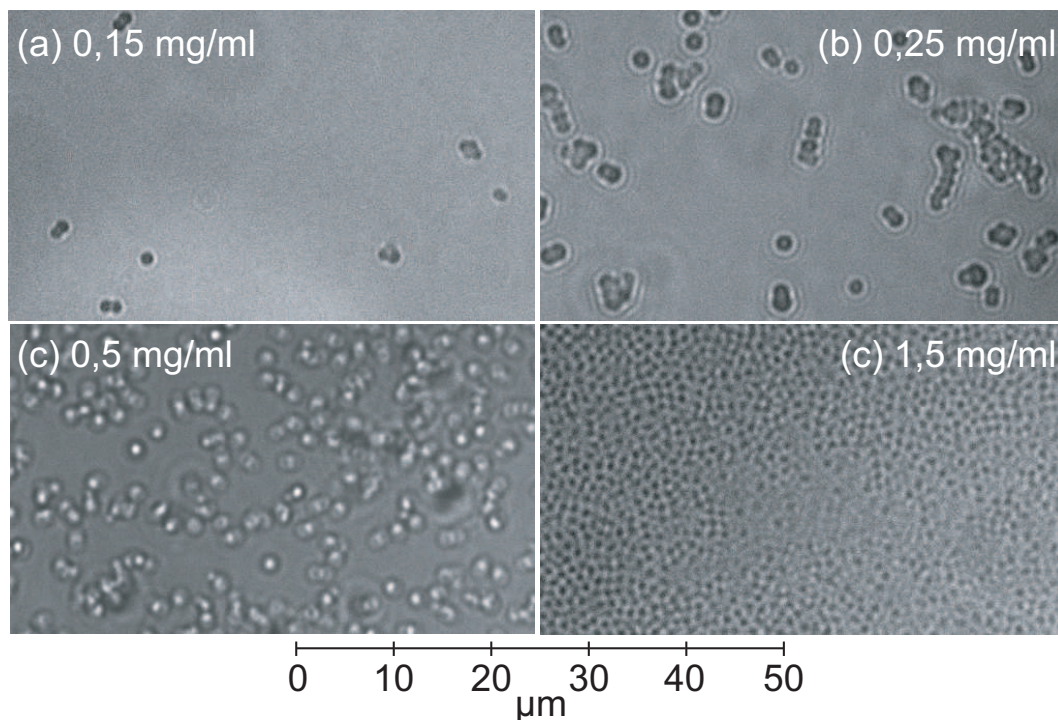


Abbildung 8.4: Bakterien-Suspension (*S. aureus*) im Durchlichtmikroskop bei (a) 0,15 mg/ml Proteine, (b) 0,25 mg/ml Proteine, (c) 0,5 mg/ml Proteine und (d) 1,5 mg/ml Proteine in Suspension bei gleicher Vergrößerung (63x).

an Bakterien sichtbar wird. Aufgrund dieser hohen Konzentration an *S. aureus* ist es kaum noch möglich, auf die Bakterien scharf zu stellen. Die Möglichkeiten des Durchlichtmikroskops sind hier fast schon ausgeschöpft.

8.3 Lumineszenzmessung

Die bakteriellen Suspensionen, wie sie in Abschnitt 8.1.2 erstellt wurden, werden mit der jeweils benötigten Photofrinkskonzentration für 90 Minuten inkubiert. Nach drei Waschvorgängen mit PBS wurden die Bakterien in PBS resuspendiert und zur Messung in die Küvette des Versuchsaufbaus aus Abschnitt 4.1 gefüllt. Die Anregung der Bakteriensuspension mit Photofrin erfolgte etwa ein bis zwei Stunden nach der Inkubation. Die Pulsenergie zur optischen Anregung von Photofrin in Suspension betrug, bei einer Laserwellenlänge von 532 nm, 90 μ J (160 mW bei 1,77 kHz). Um das Signal-Rausch-Verhältnis zu verbessern, wurden mehrere Einzelmessungen addiert, wobei bei jeder Messung eine frische Suspension verwendet wurde.

Suspensionen von $1 \cdot 10^8$ inkubierten Bakterien pro Milliliter phosphatgepufferter, physiologischer Salzlösung und einer definierten Quencher-Konzentration wurden, unter Verwendung einer Suspension mit der doppelten Konzentration an inkubierten Bakterien und der Zugabe einer Lösung mit der doppelten der gewünschten Quencher-Konzentration in H_2O -PBS, im Verhältnis 1:1 hergestellt. Die Zeitdauer zwischen dem Mischen der Zellsuspension mit der Quencherlösung und der anschließenden Messung der Singulett-Sauerstoff-Lumineszenz betrug eine Minute.

8.3.1 Lumineszenz von *S. aureus* und *E. coli*

In Abbildung 8.5 ist das Lumineszenzsignal von Singulett-Sauerstoff von Bakterien in Suspension zu sehen. In (a) wurden 0,15 mg/ml Proteine in der *S. aureus*-Bakterien-Suspension gelöst, wobei die Protein-Konzentration in der Suspension proportional der Anzahl der Bakterien in der Suspension ist. Für 90 Minuten wurde die Bakterien-Suspension mit 0,3 mg/ml Photofrin inkubiert. Es wurden vier Messungen zu $4 \cdot 10^4$ Schuss bei 160 mW Laserleistung durchgeführt und summiert. Die Lebensdauer von Singulett-Sauerstoff lässt sich in diesem Fall zu $\tau_2 = (6 \pm 2) \mu\text{s}$ bestimmen. Diese Zeit ist wesentlich länger als die Lebensdauer von Singulett-Sauerstoff in reinem H_2O ($\tau_2 = (3,5 \pm 0,5) \mu\text{s}$). Die Lumineszenz von Singulett-Sauerstoff muss also, zumindest teilweise, aus den Bakterien stammen. Um den Nachweis zu führen, dass es sich um Singulett-Sauerstoff handelt, wurde zusätzlich Natriumazid hinzugegeben (Abbildung 8.5 (b)). Die Suspension von 0,15 mg/ml Proteinen in der *S. aureus*- H_2O -Suspension wurde ebenfalls für 90 Minuten mit 0,3 mg/ml Photofrin inkubiert. Zusätzlich wurde kurz vor der Lumineszenzmessung 50 mM Natriumazid eingebracht. Es wurden fünf Messungen zu $4 \cdot 10^4$ Schuss bei 160 mW durchgeführt und summiert. Es kann gegenüber (a) eine Verkürzung der Lebensdauer von Singulett-Sauerstoff auf $\tau_2 = (3 \pm 1) \mu\text{s}$ festgestellt werden.

Analog zu den vorhergehenden Messungen wurden 0,15 mg/ml Proteine in der *E. coli*- H_2O -Suspension gelöst und für 90 Minuten mit 0,3 mg/ml Photofrin inkubiert. Es wurden fünf Messungen zu $4 \cdot 10^4$ Schuss bei 160 mW durchgeführt und summiert. Abbildung 8.5 (c) zeigt, dass kein Lumineszenzsignal zu beobachten ist. Dieses Ergebnis bestätigt die Aufnahmen des Fluoreszenzmikroskops von Abbildung 8.3 ((b), unten). Es wird kein Photofrin aufgenommen und somit kann auch kein Singulett-Sauerstoff generiert werden. Es zeigt sich aber auch, dass durch die Probenpräparation kein Photofrin ins bakterienumgebende Lösungsmittel gelangt.

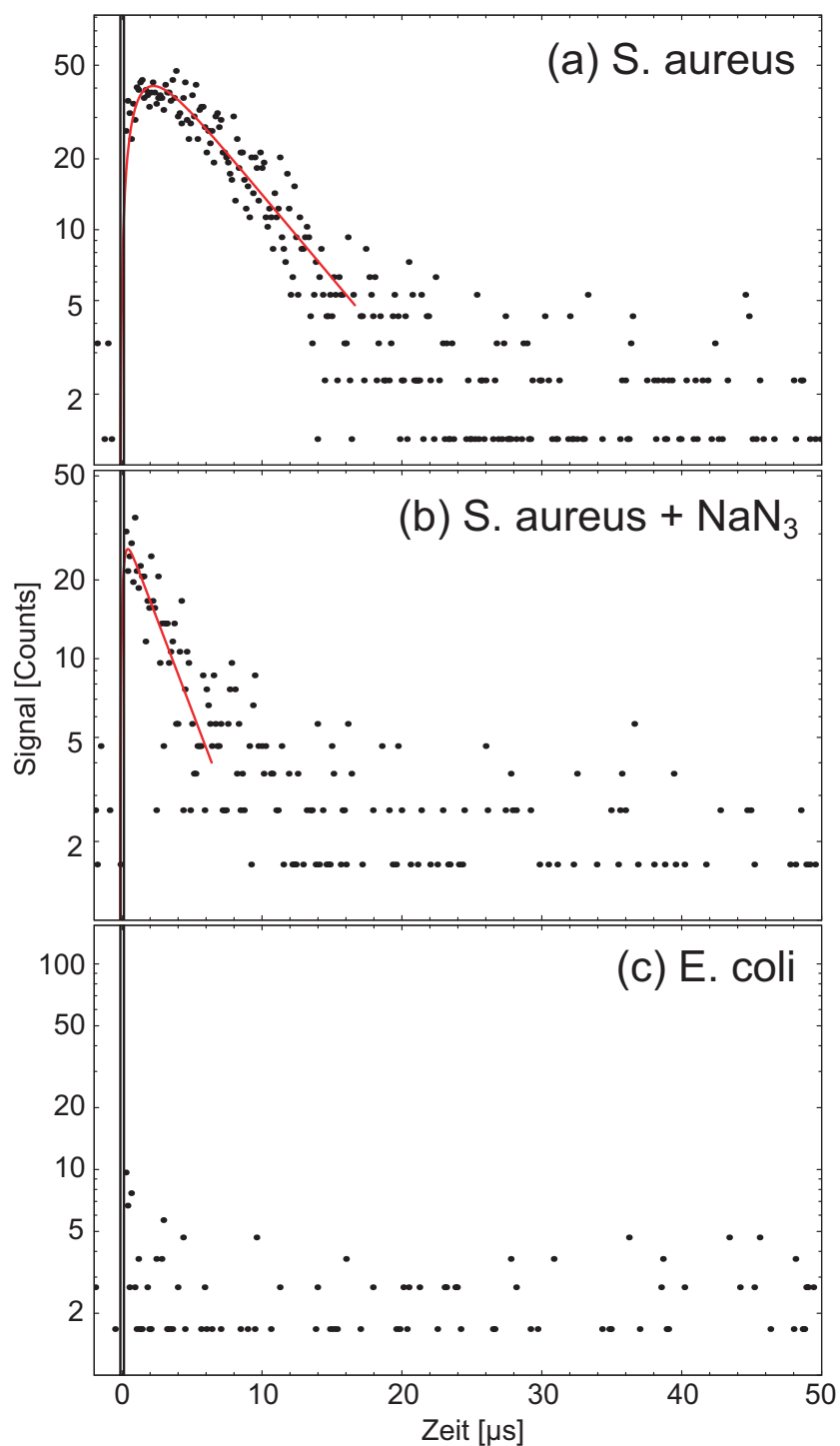
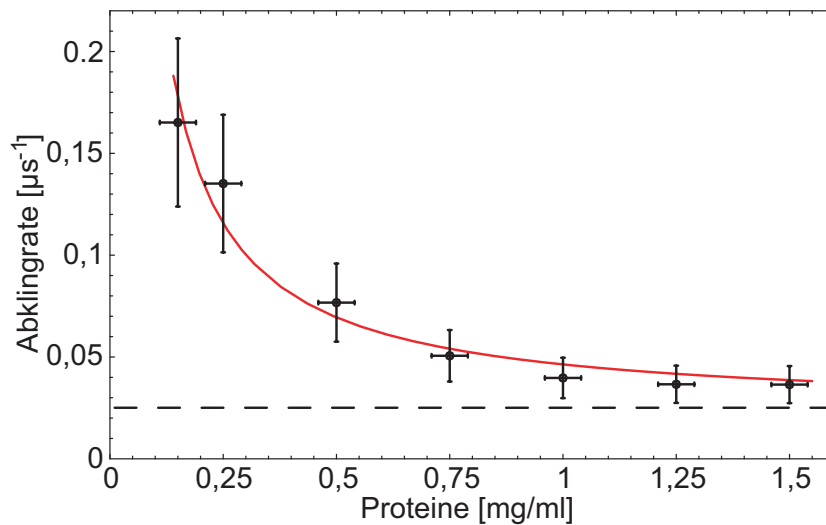


Abbildung 8.5: Singulett-Sauerstoff-Lumineszenzsignal, generiert in (a) *S. aureus*-Suspension (b) *S. aureus*-Suspension mit 50mM NaN₃ und (c) *E. coli*-Suspension. Als Farbstoff wurde jeweils Photofrin (0,3 mg/ml) für 90 Minuten inkubiert.

8.3.2 Variation der *S. aureus*-Konzentration

Zum weiteren Verständnis der *S. aureus*-Suspension wurde die Abklingrate des Lumineszenzsignals von Singulett-Sauerstoff bei unterschiedlicher *S. aureus* Bakterienzahl untersucht. Als zu variierender Parameter wurde die Protein-Konzentration der *S. aureus*-Suspension bestimmt, welche proportional zur Bakterienkonzentration ist. In Abbildung 8.6 ist die Abklingrate versus der Protein-Konzentration dargestellt. Bei jeder Proteinkonzentration wurden die Signale von fünf Proben mit



Abbildungung 8.6: Abklingraten der Lumineszenz von Singulett-Sauerstoff, generiert von 0,3 mg/ml Photofrin (90 Minuten Inkubation) in *S. aureus*-Bakterien bei unterschiedlicher Proteinkonzentration, welche proportional zur Bakterienkonzentration ist.

$6 \cdot 10^4$ Schuss bei 160 mW summiert. Jede Probe wurde mit 0,3 mg/ml Photofrin für 90 Minuten inkubiert. Die so aus dem Lumineszenzsignal ermittelten Abklingraten sind in Abbildung 8.6 aufgetragen. Bei niedriger Proteinkonzentration (0,15 mg/ml) ist die Abklingrate mit $k_{0,15} = (0,17 \pm 0,5) \mu\text{s}^{-1}$ am größten, was einer Lebensdauer von Singulett-Sauerstoff von $\tau_{0,15} = 1/k_{0,15} = (6 \pm 2) \mu\text{s}$ im System entspricht. Mit steigender Proteinkonzentration fällt die Abklingrate und läuft scheinbar gegen einen konstanten Wert von $k_{1,5} = (0,035 \pm 0,009) \mu\text{s}^{-1}$. Dieser Wert entspricht einer Lebensdauer von $\tau_{1,5} = 1/k_{1,5} = (29 \pm 7) \mu\text{s}$.

Um diesen dargestellten Zusammenhang besser verstehen zu können, betrachten wir zunächst die Diffusion von Singulett-Sauerstoff. Die Größe bzw. der Durchmesser der kugelförmigen *S. aureus*-Bakterien beträgt etwa $1 \mu\text{m}$. Die durchschnittliche Diffusionslänge von Singulett-Sauerstoff lässt sich mit der Diffusionskonstanten $D = 1,5 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$ für Lipid und Wasser (vgl. Abschnitt 6.4) abschätzen. Für $\tau_{0,15} =$

$(6 \pm 2) \mu\text{s}$ beträgt die mittlere Diffusionslänge nach Gleichung (6.1) etwa $0,2 \mu\text{m}$ bei $0,15 \text{ mg/ml}$ Protein in der Suspension. Für $1,5 \text{ mg/ml}$ Protein in der Suspension beträgt die mittlere Diffusionslänge $0,5 \mu\text{m}$ ($\tau_{1,5} = (29 \pm 7) \mu\text{s}$). Das bedeutet aber, dass der angeregte Sauerstoff, der sich im Bakterium befindet, auch in das umgebende Wasser diffundieren kann. Insbesondere ist anzunehmen, dass das Photofrin sich analog zu den HT29-Zellen, bzw. aufgrund der Affinität zu Zellmembranen [WO97], in der Zellmembran befindet. Somit befindet sich der Erzeugungsort von Singulett-Sauerstoff sehr nahe am umgebenden Wasser. Als Konsequenz ist nun wieder eine Zwischenzeit für die Lebensdauer von Singulett-Sauerstoff zu erwarten. Eine Zwischenzeit, die sich in erster Näherung aus der Wasserzeit ($\tau_2 = (3,5 \pm 0,5) \mu\text{s}$) und der unbekannten Lebensdauer von Singulett-Sauerstoff in Bakterien (Bakterienzeit) zusammensetzt.

Aufgrund des traubenförmigen Zusammenschlusses der Bakterien bei immer höheren Konzentrationen nimmt aber die Wahrscheinlichkeit zu, dass der diffundierende Sauerstoff aus einem Bakterium heraus ins nächste Bakterium und nicht ins Wasser diffundiert. Als Folgerung daraus muss sich die Zwischenzeit langsam dem Extremfall von Bakterienklumpen ohne Wasser annähern. Genau dieser Verlauf ist in Abbildung 8.6 zu sehen. Der Fit (durchgezogene Linie) zur Bestimmung der Lebensdauer von Singulett-Sauerstoff in reinen Bakterien (gestrichelte Linie) wurde mit folgender phänomenologischer Beziehung durchgeführt:

$$k(c) = \frac{k_z + (c_z^{-1} \cdot c - 1) \cdot k_B}{c_z^{-1} \cdot c} \quad (8.1)$$

$k(c)$ beschreibt die Abklingrate des Systems bei unterschiedlicher Proteinkonzentration c in der Suspension. Die Zwischenzeit τ_z für ein *S. aureus*-Bakterium im Wasser ist durch $k_z = 1/\tau_z$ repräsentiert. $c_z [\text{mg/ml}]$ entspricht der Konzentration, bei der die Zwischenzeit erreicht wird. Aufgrund des Fits wurde c_z zu $c_z = 0,16 \text{ mg/ml}$ und die Zwischenzeit τ_z für ein *S. aureus*-Bakterium im Wasser zu $\tau_z = 6,0 \mu\text{s}$ bestimmt. k_B entspricht dem Kehrwert der Lebensdauer von Singulett-Sauerstoff in Bakterien ($\tau_B = 1/k_B$) und wurde hier aus dem Fit zu $k_B = (0,025 \pm 0,010) \mu\text{s}^{-1}$ bestimmt, was einer Lebensdauer von Singulett-Sauerstoff von $\tau_B = (40 \pm 16) \mu\text{s}$ entspricht. Der Definitionsbereich für diese Funktion beträgt $[c_z, \infty[$. Bei $c = c_z$ beträgt $k(c) = k_z$ und somit ist die Zwischenzeit $t_z = 1/k_z = 6,0 \mu\text{s}$ die kürzeste Zeit, die erreicht werden kann. Was natürlich Sinn macht, da dann nur einzelne Bakterien, keine Cluster, im Wasser vorhanden sind. Für hohe Konzentrationen kann die Rate k_z vernachlässigt werden und k_B gewinnt an Bedeutung.

Die ermittelte relative lange Lebensdauer von Singulett-Sauerstoff im Bakterium ($\tau_B = (40 \pm 16) \mu\text{s}$) deutet darauf hin, dass sich der Singulett-Sauerstoff in Bereichen

befindet die nur schwach quenchent wirken. Lipide, wie z.B. das hier untersuchte Phosphatidylcholin (vgl. Abschnitt 6.2.2), bewirken eine relativ lange Lebensdauer für Singulett-Sauerstoff. Insbesondere im DL- α -Dimyristoyl-Phosphatidylcholin lebt Singulett-Sauerstoff $(31 \pm 3) \mu\text{s}$ und im Cholesterol $(25 \pm 15) \mu\text{s}$ [F05]. Die lange Lebensdauer von Singulett-Sauerstoff im Bakterium deutet also darauf hin, dass sich der Singulett-Sauerstoff in den Lipid-Bereichen der Zellmembran aufhält. Betrachtet man nun die lange Lebensdauer von etwa $40 \mu\text{s}$ bei den Bakterienklustern, welche einer Diffusionslänge von $0,7 \mu\text{m}$ entspricht, so scheint es, dass sich der Singulett-Sauerstoff nach seiner Entstehung von Zellmembran zu Zellmembran fortbewegt. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass aus dem Messergebnis die exakte Lokalisation für den Photosensibilisator im Bakterium nicht möglich ist. Auch mit dem Fluoreszenzmikroskop ist eine Lokalisation, aufgrund der Auflösung von $1 \mu\text{m}$ nicht möglich (vgl. Abbildung 8.3). Es ist aber möglich, bei einzelnen Bakterien, eine Abschätzung mit Hilfe der Diffusionslänge von $0,2 \mu\text{m}$ durchzuführen. Durch die kurze Lebensdauer von Singulett-Sauerstoff, in diesem Fall von $\tau_{0,15} = (6 \pm 2) \mu\text{s}$, kann der Entstehungsort von Singulett-Sauerstoff und somit die Photofrin-Lokalisation nicht weit entfernt vom Wasser sein. Aufgrund der Diffusionslänge von $0,2 \mu\text{m}$ kann der Farbstoff nur in einer Schale von maximal $0,2 \mu\text{m}$ im Außenbereich des Bakteriums sein. Da sich dort aber die Zellwand befindet und Photofrin eine Affinität zu Zellmembranen [WO97] hat, ist dort die Lokalisation von Photofrin zu suchen.

8.3.3 Variation der Natriumazid- und Photofrin-Konzentration

Um weitere Aussagen über die *S. aureus*-Suspension zu gewinnen, wurde in einem weiteren Experiment die Natriumazid-Konzentration variiert. In Abbildung 8.7 ist diese Messreihe dargestellt. Es wurde eine Suspension von $0,15 \text{ mg/ml}$ Protein *S. aureus* gewählt und alle Proben wurden für 90 Minuten mit $0,3 \text{ mg/ml}$ Photofrin inkubiert. Der Verlauf der Abklingrate gegen die Natriumazidkonzentration ist näherungsweise linear ansteigend. Es fällt aber auf, dass eine hohe Konzentration an Natriumazid notwendig ist, um einen Effekt zu sehen. Die Erhöhung der Abklingrate im Allgemeinen ist sicher auf das Quenchen von Singulett-Sauerstoff durch Natriumazid zurückzuführen. Zu beachten ist, dass die Lebensdauer von Singulett-Sauerstoff in einer Suspension mit $0,15 \text{ mg/ml}$ Protein eine Zwischenzeit aus Bakterienzeit und Wasserzeit ist. Der Farbstoff befindet sich im Bakterium, das Natriumazid hingegen im Wasser und im Bakterium. Die Konzentration von Natriumazid kann nur für die Suspension angegeben werden. Es ist nicht bekannt, wieviel

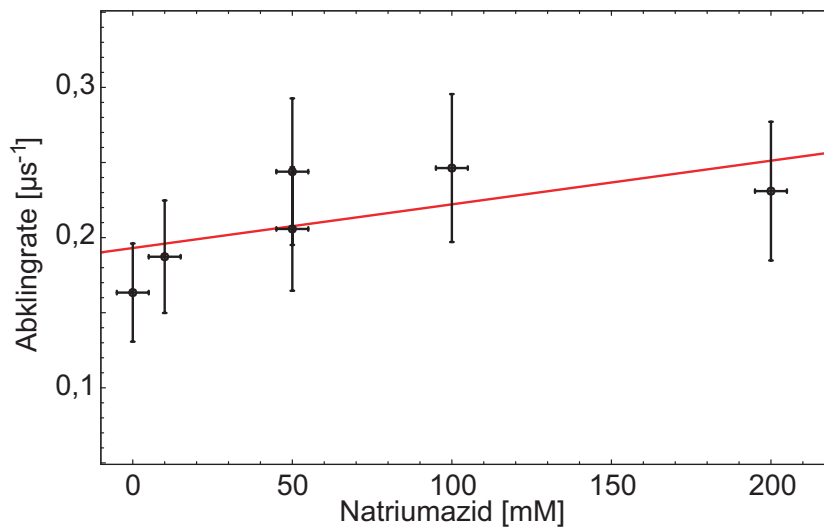


Abbildung 8.7: Abklingraten der Lumineszenz von Singulett-Sauerstoff in 0,15 mg/ml Protein-*S. aureus*-Suspension, generiert von 0,3 mg/ml Photofrin (90 Minuten Inkubation) als Funktion der NaN_3 -Konzentration.

das Bakterium aufnimmt und welche Konzentration im Wasser zurückbleibt. Trotzdem wurde versucht, eine Quencherratenkonstante, die allerdings mit sehr viel Vorsicht zu betrachten ist, zu bestimmen. Der rote Fit in Abbildung 8.7 ergibt $k_{\Delta Q} = (0,3 \pm 0,1) \cdot 10^{-3} \mu\text{s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$. In der Literatur ist diese Konstante in D_2O bekannt, $k_{\Delta Q} = (0,44 \pm 0,04) \mu\text{s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ [KMS01].

Aus der gegenüber dem Literaturwert, vergleichsweise kleinen Quencherratenkonstante, kann nun folgende Aussage abgeleitet werden. Scheinbar kommt nur ein kleiner Teil des eingesetzten Natriumazids in die Nähe des Singulett-Sauerstoffs. Der Vergleich mit der Literatur zu den Quencherratenkonstanten lässt annehmen, dass etwa 0,1 % des eingesetzten Natriumazids in Kontakt mit Singulett-Sauerstoff kommt. Berücksichtigt man, dass sich Natriumazid im Wasser sehr gut löst, ist anzunehmen, dass bei den hier verwendeten hohen Konzentrationen Singulett-Sauerstoff praktisch sofort deaktiviert wird. Die Lebensdauer von Singulett-Sauerstoff in Wasser sollte also sehr kurz sein und somit die Gesamtlebensdauer in der Suspension von der Bakterienzeit dominiert werden. Die hier gemessenen Abklingraten sind deshalb hauptsächlich vom Verhalten des Singulett-Sauerstoff im Bakterium abhängig. Aufgrund der kleinen Quencherratenkonstante ist insbesondere anzunehmen, dass Natriumazid kaum von den Bakterien aufgenommen wird bzw. kaum am Aufenthaltsort des Singulett-Sauerstoffs im Bakterium vorhanden ist.

In Abbildung 8.8 wurde die Abklingrate gegen die Photofrinkonzentration während der Inkubation aufgetragen. Die *S. aureus*-Suspension hatte eine Konzentration von

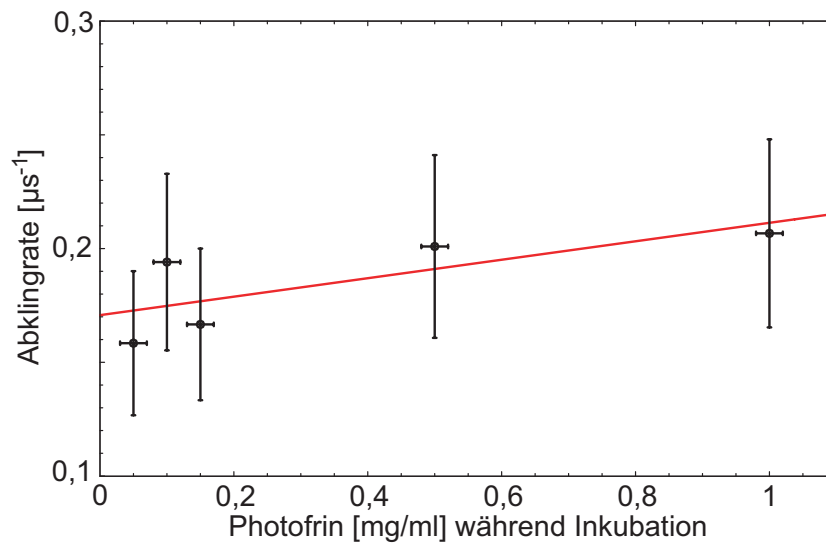


Abbildung 8.8: Abklingraten der Lumineszenz von Singulett-Sauerstoff in 0,15 mg/ml Protein-*S. aureus*-Suspension, generiert von unterschiedlichen Photofrin-Konzentrationen (90 Minuten Inkubation).

0,15 mg/ml Protein in Suspension. Photofrin wurde jeweils für 90 Minuten inkubiert. Hier kann ein Ansteigen der Abklingrate bei steigender Photofrin-Konzentration beobachtet werden. Aber hier gilt, dass die angegebene Photofrinkonzentration die Inkubationskonzentration ist und nicht die tatsächlich im Bakterium vorhandene Konzentration. Auch ist nicht bekannt, ob Photofrin, aufgrund der Diffusion, vom Bakterium ins Wasser diffundieren kann. Aufgrund der Ergebnisse bzw. der ansteigenden Rate kann aber angenommen werden, dass bei steigender Inkubationskonzentration die lokale Konzentration ansteigt. Es ist aber nicht bekannt, in welchem Zusammenhang dies geschieht und deshalb ist die hier ermittelte Ratenkonstante ($k_{\Delta F} = (0,04 \pm 0,02) \mu\text{s}^{-1} \text{ ml/mg}$) mit Vorsicht zu betrachten. Für Photofrin in D_2O ist in der Literatur $k_{\Delta F}$ bekannt zu $k_{\Delta F} = (0,025 \pm 0,003) \mu\text{s}^{-1} \text{ ml/mg}$ [KMS01]. Im Rahmen der Messgenauigkeit scheint aber das Quenchen von Singulett-Sauerstoff durch Photofrin in Lösung ähnlich dem in *S. aureus*-Bakterien-Suspension zu sein.

8.4 Zelltoxizität

Bisher wurde nur der Nachweis geführt, dass Singulett-Sauerstoff in Bakterien erzeugt werden kann. Nun wollen wir kurz darauf eingehen, ob Singulett-Sauerstoff *S. aureus*-Bakterien zerstören kann. Diese Untersuchungen wurden an der Klinik und Poliklinik für Dermatologie der Universität Regensburg durchgeführt. Dabei

wurden 10^8 bis 10^9 Bakterien pro Milliliter im Dunkeln für 90 Minuten mit Photofrin inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Bakterien dreimal mit PBS gewaschen und in PBS resuspendiert. Danach in Einheiten zu $200\ \mu\text{l}$ für 10 Minuten mit Licht der Energiedichte $24\ \text{J}/\text{cm}^2$ belichtet. Als Lichtquelle diente die inkohärente Lichtquelle PDT1200 (Waldmann Medizintechnik, Villingen-Schwenningen, Deutschland) die zwischen 580 nm und 740 nm strahlt. Alle Bakterienkulturen (mit und ohne Photofrin) wurden vor und nach dem Beleuchten immer im Dunkeln belassen. Die Anzahl der überlebenden Bakterien wurde mit dem CFU-Assay (colony forming units) Verfahren festgestellt. Dabei wurden beleuchtete und unbeleuchtete Bakterien für 18 - 24 Stunden in eine BHI-Brühe eingebracht. Danach wurden die entstandenen Kolonien pro Milliliter gezählt. Natriumazid (50 mM) wurde, wenn gewünscht, als Quencher 60 Minuten vor der Bestrahlung zugegeben. Die Experimente wurde mindestens zweimal wiederholt.

In Tabelle 8.1 sind die Ergebnisse zusammengestellt. Die Photofrinkonzentration

Photofrin [$\mu\text{g}/\text{ml}$]	Quencher [50 mM]	unbestrahlt [CFU/ml]	bestrahlt [CFU/ml]
0	-	$7 \cdot 10^7$	$7 \cdot 10^7$
0,1	-	$5 \cdot 10^7$	$3 \cdot 10^6$
1	-	$5 \cdot 10^6$	$7 \cdot 10^1$
5	-	$3 \cdot 10^6$	$1 \cdot 10^1$
10	-	$1 \cdot 10^6$	$1 \cdot 10^0$
0	NaN_3	$5 \cdot 10^7$	$5 \cdot 10^7$
0,1	NaN_3	$6 \cdot 10^7$	$8 \cdot 10^6$
1	NaN_3	$2 \cdot 10^7$	$4 \cdot 10^5$
5	NaN_3	$4 \cdot 10^7$	$1 \cdot 10^4$
10	NaN_3	$2 \cdot 10^7$	$1 \cdot 10^2$

Tabelle 8.1: Überlebende *S. aureus* Bakterien (CFU/ml) ausgehend von 10^8 Bakterien pro Milliliter, welche mit Photofrin für 90 Minuten inkubiert bzw. gegebenenfalls mit 50 mM Natriumazid behandelt wurden. Es wurden jeweils mindestens drei unabhängige Experimente durchgeführt. Der Fehler beträgt 10 %.

wurde dabei von 0 mg/ml bis $10\ \mu\text{g}/\text{ml}$ variiert (erste Spalte). In der dritten Spalte ist zu sehen, dass ohne zwischenzeitliche Beleuchtung die Anzahl der überlebenden Bakterien, mit steigender Photofrinkonzentration, von $7 \cdot 10^7$ auf $1 \cdot 10^6$ fällt. Es ster-

ben also auch Bakterien aufgrund der Anwesenheit von Photofrin, ohne dass eine Beleuchtung notwendig ist. Dies wird als Dunkeltoxizität bezeichnet. Beleuchtet man die Suspension zusätzlich (vierte Spalte), sterben die *S. aureus*-Bakterien mit steigender Photofrinkonzentration sehr schnell. Bei 10 $\mu\text{g/ml}$ an Photofrin werden praktisch alle getötet. Singulett-Sauerstoff greift also die Bakterien an und zerstört diese.

Bringt man zusätzlich Natriumazid in die Suspension ein, sterben wesentlich weniger Bakterien als ohne Quencher (Tabelle 8.1 untere Hälfte, rechts). Natriumazid verkürzt die Lebensdauer von Singulett-Sauerstoff und somit hat der angeregte Sauerstoff weniger Zeit, Schäden an den Bakterien zu verursachen. Als Resultat sterben mit Natriumazid weniger Bakterien als ohne.

Kapitel 9

Übersicht über die Ergebnisse und Erkenntnisse bei 532 nm Anregung

Ziel der vorhergehenden Kapitel war es, vom einfachen System Singulett-Sauerstoff in Lösung ausgehend, komplexere Systeme zu verstehen. Sowohl Lipidsuspensionen als auch reines Lipid wurde untersucht. Darauf aufbauend wurde auch die Lumineszenz von Singulett-Sauerstoff im lebenden Organismus wie Zelle und Bakterium detektiert und analysiert. In dieser Zusammenfassung sollen alle wichtigen Ergebnisse und Erkenntnisse nochmals in kurzer Form dargestellt werden.

9.1 Singulett-Sauerstoff in Lösung

In Kapitel 5 wurde Singulett-Sauerstoff im Lösungsmittel generiert. In Tabelle 9.1 sind die gewonnenen Ergebnisse dargestellt. Alle Messungen fanden in luftgesättigten Lösungen statt.

Es wurde gezeigt, dass Singulett-Sauerstoff über seine Lumineszenz detektiert werden kann. Als Beweis für die Echtheit des Signals wurde ein Lumineszenzspektrum aufgenommen, das bei der typischen Wellenlänge von 1269 nm eine Ausprägung zeigt. Die definierte Lebensdauer von Singulett-Sauerstoff in definierten Lösungsmitteln kann das Signal ebenfalls als Lumineszenz von Singulett-Sauerstoff ausweisen. Die häufigste angewandte Methode um Singulett-Sauerstoff nachzuweisen ist das Quenchen der Lebensdauer von Singulett-Sauerstoff durch Natriumazid. Am Beispiel Tetraazaporphyrin in EtOD wurde die Raten und Ratenkonstanten für

Farbstoff	Lösungsmittel	Quencher NaN ₃	Lebensdauer von Singulett-O ₂	
			gemessen	Literatur
50 $\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ Photofrin	H ₂ O	-	(3,5±0,5) μs	3,1 - 4,2 μs [WHR95]
50 $\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ Photofrin	D ₂ O	-	(57±8) μs	44 - 70 μs [WHR95]
0,1 mM ATMPn	EtOD	-	(31±4) μs	(31±2) μs [BME02]
0,1 mM ATMPn	EtOD	0,5 mM	(7,7±1,1) μs	-

Tabelle 9.1: Die Lebensdauer von Singulett-Sauerstoff in unterschiedlichen Lösungen.

dieses System ermittelt. In Tabelle 9.2 sind diese dargestellt. Im Rahmen der Messgenauigkeit lies sich nicht eindeutig entscheiden, ob im System ein Energierücktransfer statt findet. Als Maß für den Rücktransfer konnte das Produkt $k_{\Delta T_1}^{\Pi}$ nur nach oben ab-

Raten und Ratenkonstanten	Wert	Einheit
k_{Δ}	0,031±0,005	μs^{-1}
$k_{\Delta P}^{\Sigma} = k_{\Delta S_0} + k_{\Delta T_1}$	0,6±0,1	$\mu\text{s}^{-1}\text{mM}^{-1}$
k_{T_1}	0,0010±0,0001	μs^{-1}
$k_{T_1 O}^{\Sigma} = k_{T_1 O_2} + k_{T_1 \Delta}$	3,8±0,6	$\mu\text{s}^{-1}\text{mM}^{-1}$
$k_{T_1 S_0}$	1,6±0,3	$\mu\text{s}^{-1}\text{mM}^{-1}$
$k_{\Delta T_1}^{\Pi} = k_{T_1 \Delta} \cdot k_{\Delta T_1}$	0,8±0,8	$\mu\text{s}^{-2}\text{mM}^{-2}$
$k_{\Delta Q}$	0,25±0,05	$\mu\text{s}^{-1}\text{mM}^{-1}$
$k_{T_1 Q}$	0,01±0,01	$\mu\text{s}^{-1}\text{mM}^{-1}$

Tabelle 9.2: Übersicht über die ermittelten Raten und Ratenkonstanten von Tetraazaporphyrin in EtOH. Literaturwerte sind nicht bekannt.

geschätzt werden. Die Lebensdauer von Singulett-Sauerstoff in EtOD konnte zu $\tau_{\Delta} = 1/k_{\Delta} = (32\pm 5) \mu\text{s}$ bestimmt werden. Die Triplett-Lebensdauer von Tetraazaporphyrin in EtOD beträgt $\tau_{T_1} = 1/k_{T_1} = (1,0\pm 0,1) \text{ ms}$.

9.2 Singulett-Sauerstoff in Suspension

Als erstes komplexeres System auf dem Weg zur Zelle wurde die Lipidsuspension untersucht. In Tabelle 9.3 sind die wichtigsten Ergebnisse aus Kapitel 6 zusammengefasst. Alle Messungen fanden auch hier unter Normaldruck statt.

Farbstoff	Untersuchtes System	Lebensdauer von Singulett-O ₂	
		gemessen	Literatur
50 $\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ Photofrin	Aufstrich ^a	(14±2) μs	12,2 μs [EAF98]
50 $\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ Photofrin	Aufstrich ^b	(13±2) μs	12,2 μs [EAF98]
50 μM ATMPn	Aufstrich ^c	(13±2) μs	12,2 μs [EAF98]
50 $\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ Photofrin	H ₂ O-Suspension	(7,3±1,1) μs	-
50 μM ATMPn	H ₂ O-Suspension	(8,8±1,3) μs	-

Tabelle 9.3: Die Lebensdauer von Singulett-Sauerstoff in Lipidaufstrichen und Lipid-H₂O-Suspensionen. ^a Aufstrich wurde aus Lipid-H₂O-Suspension erstellt. ^b Aufstrich wurde aus Lipid-D₂O-Suspension erstellt. ^c Aufstrich wurde aus Lipid-H₂O-EtOH-Suspension erstellt.

Die Lipidsuspension wurde mit dem Fluoreszenz- und Durchlichtmikroskop untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass die Lipidtröpfchen von einer Lipidschicht begrenzt sind und im Inneren ein Gemisch aus Lipid und Wasser enthalten. Im Lipid lebt Singulett-Sauerstoff (15±3) μs und im Wasser (3,5±0,5) μs . Aufgrund der Diffusion kommt der Singulett-Sauerstoff mit den Lipid- und Wasserbereichen in Berührung. Als Konsequenz lebt Singulett-Sauerstoff im Mittel zwischen der Wasserlebensdauer von (3,5±0,5) μs und der Lipidlebensdauer von (15±3) μs . Im Fall von 15 mg/ml L- α -Phosphatidylcholin in Wasser beträgt die Zwischenzeit $\tau_2 = (8\pm1)$ μs . Durch Simulationen, die dem Differentialgleichungssystem (3.9) und der Diffusion vom Singulett-Sauerstoff gerecht werden, konnte ein einfaches Modell gefunden werden. Eine Lipidkugelschale mit 0,15 μm Schalendicke und einem Durchmesser größer als 2 μm , die innen und außen von Wasser umgeben ist, beschreibt das Lipidtröpfchen in der Suspension, bezüglich der Lebensdauer von Singulett-Sauerstoff, am besten.

9.3 Singulett-Sauerstoff in zellulärer Umgebung

Ziel von Kapitel 7 war die Detektion von Singulett-Sauerstoff in lebenden Zellen. Außerdem sollte ein Zusammenhang zwischen der Lokalisation des Photosensibilisators und der Lebensdauer von Singulett-Sauerstoff in den lebenden Zellen gezeigt werden. In Tabelle 9.4 sind die Erkenntnisse aus Kapitel 7 zusammengefasst. Alle Messungen fanden in luftgesättigten Lösungen statt.

Farbstoff	Quencher NaN ₃	Zelle	Lokalisation	Lebensdauer von Singulett-O ₂
50 $\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ Photofrin 1,5 h inkubiert	-	HT29 8·10 ⁶ /ml	Zellmembran	(10±3) μs
50 $\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ Photofrin 24 h inkubiert	-	HT29 8·10 ⁶ /ml	Zellmembran der Mitochondrien	(11±3) μs
50 $\frac{\mu\text{g}}{\text{ml}}$ Photofrin 24 h inkubiert	50 mM	HT29 8·10 ⁶ /ml	Zellmembran der Mitochondrien	(4±2) μs
50 μM ATMPn 24 h inkubiert	-	HT29 8·10 ⁶ /ml	Zellmembran der Lysosome	(6±2) μs
50 μM ATMPn 24 h inkubiert	50 mM	HT29 8·10 ⁶ /ml	Zellmembran der Lysosome	(2,5±1,0) μs

Tabelle 9.4: Die Lebensdauer von Singulett-Sauerstoff in lebenden HT29-Zellen in H₂O-Suspensionen sowie die Lokalisation des Photosensibilisators. Vergleichbare Literaturwerte sind nicht bekannt.

Die Lokalisation der Photosensibilisatoren konnte mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops bestimmt werden. Photofrin befindet sich nach 90 Minuten Inkubationszeit in der Zellmembran und nach 24 Stunden in der Membran der Mitochondrien. ATMPn befindet sich nach 24 Stunden in der Membran der Lysosomen. Die Lumineszenz von Singulett-Sauerstoff konnte in allen Fällen, generiert durch die Photosensibilisatoren, nachgewiesen werden. Aufgrund der gemessenen langen Lebensdauer von Singulett-Sauerstoff ((10±3) μs bei 90 Minuten Photofrin-Inkubation), gegenüber der möglichen kurzen Lebensdauer von (3,5±0,5) μs im Wasser, muss das Lumineszenzsignal aus der Zelle stammen. Hinzu kommt, dass ATMPn nicht wasserlöslich ist. Das bedeutet aber, dass der Singulett-Sauerstoff, welcher durch ATMPn generiert wurde, in der Zelle sein muss. Es konnte also eindeutig bewiesen werden, dass erstmals Singulett-Sauerstoff in lebenden Zellen direkt nachgewiesen wurde. Die

unterschiedlichen Lebensdauern von Singulett-Sauerstoff in den Zellen sollten von der unterschiedlichen Lokalisation der Photosensibilisatoren, und der damit verbundenen unterschiedlichen Umgebung für den Singulett-Sauerstoff, herrühren.

9.4 Singulett-Sauerstoff in bakterieller Umgebung

Neben den HT29-Zellen wurden in Kapitel 8 auch Bakteriensuspensionen untersucht. In Tabelle 9.5 sind die Ergebnisse zusammengefasst. Alle Messungen fanden

Farbstoff	Quencher NaN ₃	Zelle	Lokalisation	Lebensdauer von Singulett O ₂
0,3 $\frac{\text{mg}}{\text{ml}}$ Photofrin 1,5 h inkubiert	-	S. aureus 0,15 $\frac{\text{mg}}{\text{ml}}$	Im Bereich der Zellmembran	(6±2) μs
0,3 $\frac{\text{mg}}{\text{ml}}$ Photofrin 1,5 h inkubiert	50 mM	S. aureus 0,15 $\frac{\text{mg}}{\text{ml}}$	Im Bereich der Zellmembran	(3±1) μs
0,3 $\frac{\text{mg}}{\text{ml}}$ Photofrin 1,5 h inkubiert	-	S. aureus ohne H ₂ O	Im Bereich der Zellmembran	(40±16) μs extrapoliert
0,3 $\frac{\text{mg}}{\text{ml}}$ Photofrin 1,5 h inkubiert	-	E. coli 0,15 $\frac{\text{mg}}{\text{ml}}$	-	-

Tabelle 9.5: Die Lebensdauer von Singulett-Sauerstoff in lebenden Zellen in H₂O-Suspensionen sowie die Lokalisation des Photosensibilisators. Vergleichbare Literaturwerte sind nicht bekannt.

in luftgesättigten Lösungen statt.

Mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops konnte nachgewiesen werden, dass S. aureus-Bakterien Photofrin aufnehmen, E. coli-Bakterien hingegen nicht. Aufgrund dieser Tatsache konnte nur in S. aureus-Bakterien Singulett-Sauerstoff erzeugt und detektiert werden. Durch Variation der Bakteriendichte in der Suspension und der Tatsache, dass sich Bakterien zu Klumpen zusammenfinden, konnte die Lebensdauer von Singulett-Sauerstoff in S. aureus-Bakterien zu (40±16) μs abgeschätzt werden. In H₂O-Suspensionen von einzelnen S. aureus-Bakterien (15 mg/ml Protein) konnte eine Lebensdauer von Singulett-Sauerstoff von (6±2) μs ermittelt werden. Diese Lebensdauer ist eine Zwischenzeit von der Lebensdauer von Singulett-Sauerstoff im Wasser ((3,5±0,5) μs) auf der einen und der Singulett-Sauerstoff-Lebensdauer im Bakterium auf der anderen Seite. Mit Hilfe der Lebensdauer von Singulett-Sauerstoff

und der daraus ermittelten Diffusionslänge konnte, mit einer Unschärfe von $0,2\ \mu\text{m}$, die Lokalisation von Photofrin bestimmt werden. Photofrin ist in den äußeren Bereichen, wahrscheinlich in der äußeren Zellmembran, des Bakteriums lokalisiert. Durch zelltoxische Messungen konnte gezeigt werden, dass Singulett-Sauerstoff S. aureus-Bakterien abtöten kann.

Kapitel 10

Messung bei der Anregungswellenlänge von 355 nm

In diesem experimentellen Kapitel betrachten wir die Erzeugung und Detektion von Singulett-Sauerstoff ohne die Verwendung von zusätzlichen Photosensibilisatoren. Es werden nur Stoffe verwendet und untersucht, die auch in lebenden Zellen vorkommen. Es soll nachgewiesen werden, dass durch UVA-Licht Singulett-Sauerstoff in Zellen generiert werden kann.

Die durch UV-Licht bedingte vorzeitige Hautalterung, kann neben der direkten Schädigung von Zellen durch UV-Licht, auch durch reaktive Sauerstoffspezien (ROS) wie Sauerstoffradikale und Singulett-Sauerstoff erfolgen [HS98]. Es ist auch bekannt, dass ROS die DNA verändern können und somit die Erzeugung von Krebs fördern. Die UVB-Komponente (280 - 320 nm) des Sonnenlichts dringt in tiefe Hautschichten vor und wird leicht von Makromolekülen wie Proteinen, Lipiden und DNA absorbiert, was zu Schädigungen bis hin zu Hautkrebs führen kann. Die UVA-Komponente (320 - 400 nm) galt bislang als weniger gefährlich. Neuere Untersuchungen [MLM03] zeigen aber, dass UVA-Strahlung ebenfalls biologisch schädigende Wirkungen hat, bei denen insbesondere Singulett-Sauerstoff eine große Rolle spielt. Die Haut, das größte Organ des Menschen, ist dem Sonnenlicht und damit der UVA-Strahlung besonders ausgesetzt. Hautalterung und Hautkrebs durch UVA-Strahlung wird dabei hauptsächlich durch Singulett-Sauerstoff hervorgerufen [WHS05]. UVA-Licht ist ebenfalls für die polymorphe Lichtdermatose (verzögerter Hautausschlag nach intensiver Sonneneinstrahlung) verantwortlich.

Bis heute ist der Mechanismus der Entstehung von Lichtdefekten in der Haut durch UVA-Strahlung jedoch nicht vollständig verstanden [HS98]. Im Gewebe wird das

UVA-Licht nur schwach absorbiert und nur wenige Substanzen können dort als Photosensibilisator wirken. Bisher wurden Flavine [VEF03], NAD/NADP [SW96] und Urocaninsäure [HS98] als mögliche endogene Photosensibilisatoren identifiziert. Leider war der Nachweis der Generation von Singulett-Sauerstoff durch diese Photosensibilisatoren bisher nur indirekt, z.B. über Quencher wie Natriumazid, möglich [WHS05, BPB04, PDC03]. Dieser indirekte Nachweis von Singulett-Sauerstoff ist aber sehr ungenau und enthält viele Fehlerquellen (vgl. Abschnitt 3.4).

Im Folgenden wollen wir nun die Ergebnisse des direkten Nachweises von Singulett-Sauerstoff durch seine Lumineszenz generiert von diesen endogenen Photosensibilisatoren, darstellen. Diese wesentlich genauere Nachweismethode soll nun weitere Erkenntnisse zur UVA-induzierten Erzeugung von Singulett-Sauerstoff liefern. Als Anregungsquelle wurde der frequenzverdreifachte Nd:YAG-Laser aus Abschnitt 4.1 bei 355 nm verwendet.

10.1 Verwendete endogene Substanzen

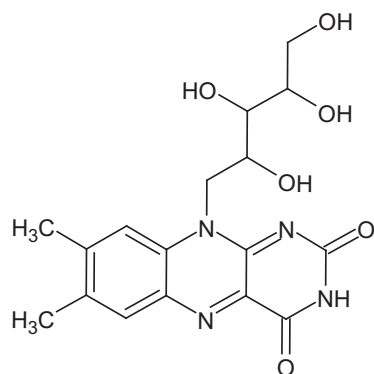
Im Folgenden seien nun die in diesem Kapitel verwendeten potentiellen endogenen Photosensibilisatoren beschrieben und bezüglich ihres Absorptionsspektrums untersucht.

10.1.1 Endogene Flavine

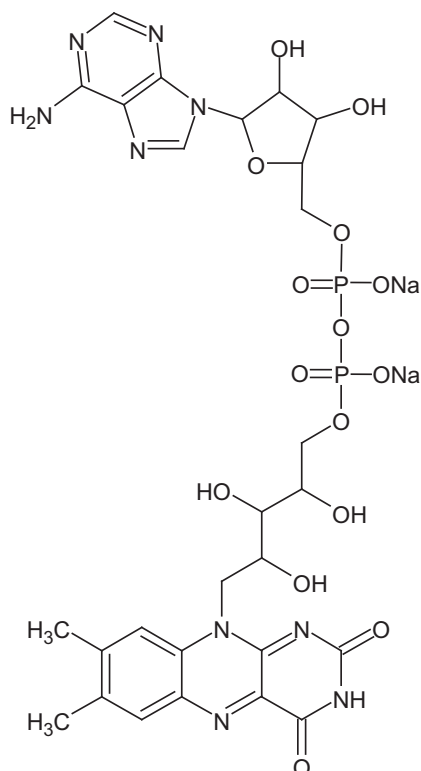
Unter Flavinen versteht man eine Gruppe natürlicher gelber Farbstoffe, denen das Ringsystem, bestehend aus drei organischen Ringen, des Isoalloxazins (Flavin) zugrunde liegt. Die verschiedenen Flavine unterscheiden sich durch den Rest, der sich am mittleren organischen Ring am Stickstoffatom (N) befindet.

Eine wichtige Substanz dieser Gruppe ist das zum Vitamin-B-Komplex gehörende Riboflavin (auch: Lactoflavin, Vitamin B2), das als Bestandteil (Koenzym) von Wasserstoff-übertragenden Enzymen, den sogenannten Flavoproteinen, im Stoffwechsel der Zelle eine große Bedeutung für die Atmungskette hat. Ein Enzym ist ein Protein, welches eine chemische Reaktion katalysiert. Wie andere Katalysatoren auch beschleunigen Enzyme chemische Reaktionen, indem sie die Aktivierungsenergie herabsetzen, die überwunden werden muss, damit es zu einer Stoffumsetzung kommt. Abbildung 10.1 (a) zeigt die Strukturformel von Riboflavin (Reinheit 99 %, Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)) [S05]. Die molare Masse von Riboflavin beträgt

(a) Riboflavin



(c) FAD



(b) FMN

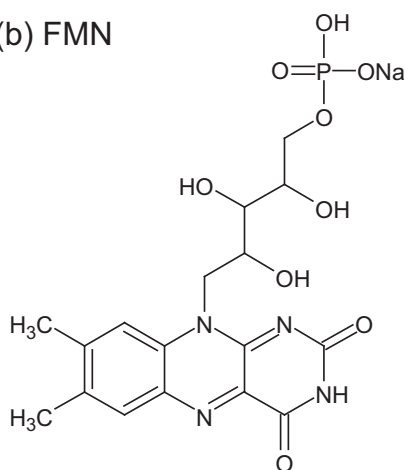


Abbildung 10.1: Strukturformel von (a) Riboflavin, (b) FMN und (c) FAD.

$m_M = 376,36 \text{ g/mol}$. Die Summenformel lässt sich als $C_{17}H_{20}N_4O_6$ darstellen. Riboflavin löst sich sehr gut in Wasser und eher schlecht in Lösungsmitteln wie EtOH. FMN (Flavin-Mononukleotid, Riboflavin-5-Phosphat) ist ein von Riboflavin abgeleitetes Koenzym. Seine Molmasse beträgt $m_M = 478,33 \text{ g/mol}$. Abbildung 10.1 (b) zeigt die Strukturformel von FMN (Reinheit 95 %, Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)) [S05]. Die Summenformel lässt sich als $C_{17}H_{20}N_4NaO_9P$ darstellen. FMN löst sich ebenfalls gut in Wasser.

FAD (Flavin-Adenin-Dinukleotid, Riboflavin 5-Adenin Diphosphat) ist ebenfalls ein von Riboflavin abgeleitetes Koenzym. FAD besteht aus einer AMP-Einheit (Adenosinmonophosphat), an welche das Flavin-Mononukleotid (FMN) gebunden ist. AMP entsteht wenn ATP (Adenosintriphosphat), der Energieträger der Zelle, seine Energie abgibt. Die Molmasse von FAD beträgt $m_M = 829,51 \text{ g/mol}$. In Abbildung 10.1 (c) ist die Struktur von FAD (Reinheit 95 %, Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland))

zu sehen [S05]. Die Summenformel lautet $C_{27}H_{31}N_9Na_2O_{15}P_2$. FAD löst sich ebenfalls gut in Wasser.

In Abbildung 10.2 ist der Absorptionsquerschnitt von Riboflavin, FMN und FAD in Wasser in Abhängigkeit von der Wellenlänge aufgetragen. Zu erkennen ist eine

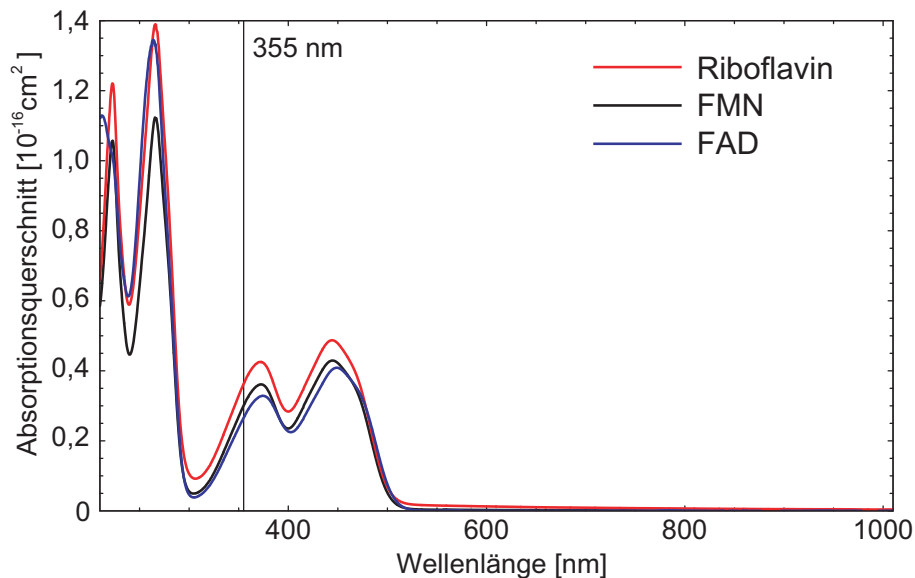


Abbildung 10.2: Absorptionsquerschnitt von Riboflavin, FMN und FAD in Wasser in Abhängigkeit von der Wellenlänge. Die untersuchten Lösungen hatten eine Konzentration von jeweils 50 μM .

starke Absorption der Flavine für kleinere Wellenlängen als 300 nm. Im Bereich von 320 nm bis 500 nm ist ebenfalls eine Absorption zu erkennen. Das Anregungslicht (355 nm) unseres frequenzverdreifachten Nd:YAG-Lasers sollte also gut absorbiert werden. Der Absorptionsquerschnitt von Riboflavin beträgt bei der verwendeten Anregungswellenlänge von 355 nm $\sigma_{355nm} = (3,6 \pm 0,2) \cdot 10^{-17} \text{ cm}^2$. Für FMN beträgt der Absorptionsquerschnitt bei 355 nm $\sigma_{355nm} = (3,0 \pm 0,2) \cdot 10^{-17} \text{ cm}^2$ und für FAD $\sigma_{355nm} = (2,7 \pm 0,2) \cdot 10^{-17} \text{ cm}^2$.

10.1.2 Weitere endogene Substanzen

Neben den Flavinen wurden weitere mögliche endogene Photosensibilisatoren (NAD, NADP, Cholesterin und Urocaninsäure) untersucht.

NAD (Nicotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid) ist ein Wasserstoff-transportierendes Koenzym, das an zahlreichen Redoxreaktionen des Stoffwechsels der Zelle beteiligt

ist. Abbildung 10.3 (a) zeigt die Strukturformel von NAD (Reinheit 99 %, Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)) [S05]. Die molare Masse von NAD beträgt $m_M =$

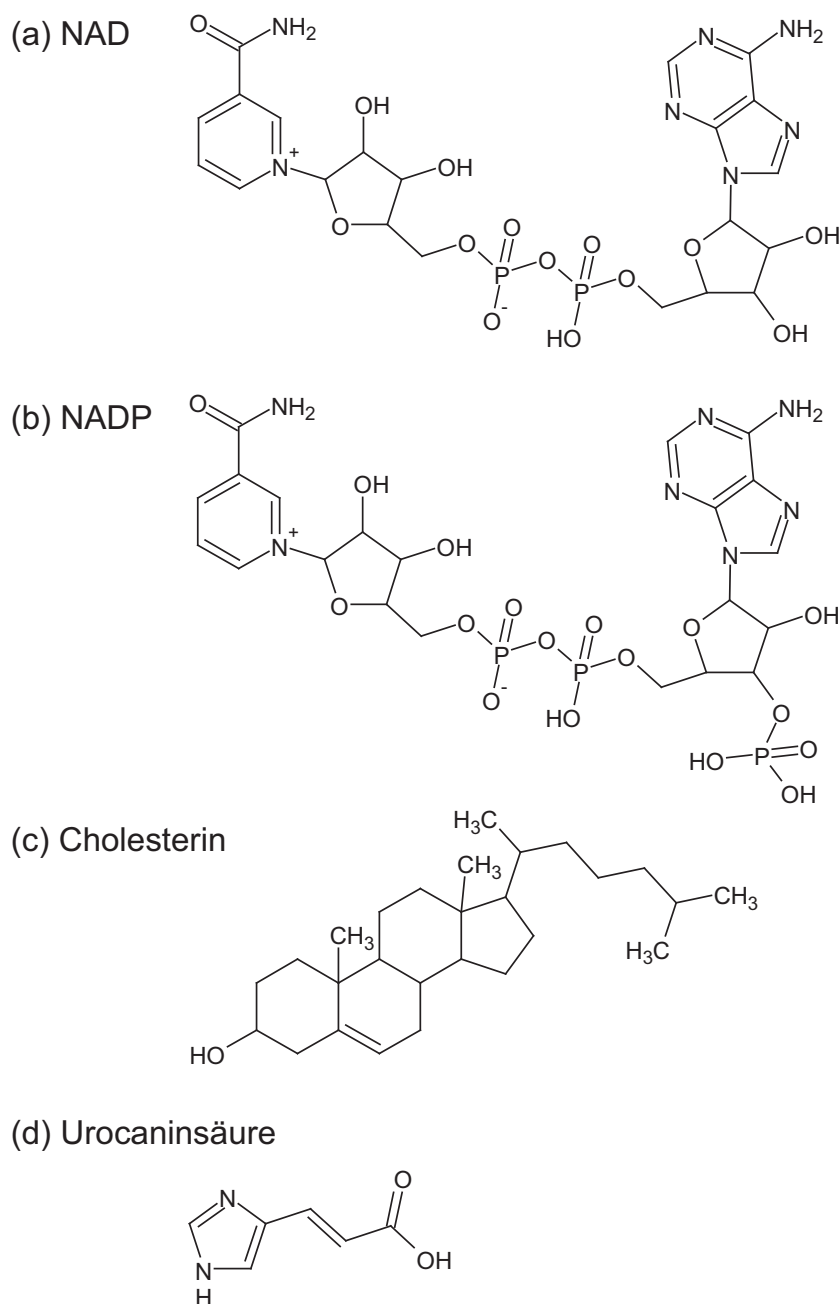


Abbildung 10.3: Strukturformel von (a) NAD, (b) NADP (c) Cholesterin und (d) Urocaninsäure. [S05].

663,43 g/mol. Die Summenformel lässt sich als $C_{21}H_{27}N_7O_{14}P_2$ darstellen. NAD ist gut wasserlöslich.

Im Gegensatz zum NAD hat das NADP (Nicotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat) einen Phosphat-Rest am Adenosin des Dinucleotids. NADP ist sonst

jedoch identisch mit NAD, und hat die gleiche Funktion als Koenzym. Die Strukturformel von NADP (Reinheit 95 %, Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)) [S05] ist in Abbildung 10.3 (b) dargestellt. Die molare Masse von NADP ist $m_M = 743,41 \text{ g/mol}$ und die Summenformel lautet $\text{C}_{21}\text{H}_{28}\text{N}_7\text{O}_{17}\text{P}_3$. NADP ist wasserlöslich.

Das Cholesterin (auch: Cholesterol) ist ein Steroid (vier organische Ringe), das den Lipiden zugerechnet wird. Cholesterin ist essentieller Bestandteil aller tierischen Zellmembranen (vgl. Abbildung 7.2) und erhöht deren Stabilität. Es ist, zusammen mit Proteinen, in der Zellmembran an der Ein- und Ausschleusung von Signalstoffen beteiligt. Zellwachstum und Zellteilung sind ohne genügend Cholesterin nicht möglich, es stellt den Ausgangsstoff für die Bildung von z.B. Gallensäuren, Hormonen und Vitamin D dar. In Abbildung 10.3 (c) ist die Strukturformel von Cholesterin (Reinheit 99 %, Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)) [S05] dargestellt. Die molare Masse von Cholesterin ist $m_M = 386,65 \text{ g/mol}$ und die Summenformel lautet $\text{C}_{27}\text{H}_{46}\text{O}$. Cholesterin löst sich nicht in Wasser aber gut in Ethanol.

Die Urocaninsäure ist Bestandteil des menschlichen Schweißes und schützt vor UVB-Strahlen, indem sich unter deren Einfluss die trans-Urocaninsäure in die energiereichere cis-Form umwandelt. Auf diese Weise wird die Strahlenenergie absorbiert und abgeleitet. Abbildung 10.3 (d) zeigt die Strukturformel von Urocaninsäure (Reinheit 99 %, Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)) [S05]. Die molare Masse der Urocaninsäure beträgt $m_M = 138,12 \text{ g/mol}$. Die Summenformel lässt sich als $\text{C}_6\text{H}_6\text{N}_2\text{O}_2$ darstellen. Die Urocaninsäure löst sich gut in EtOH und schlecht in Wasser.

In Abbildung 10.4 ist der Absorptionsquerschnitt von NAD und NADP in Wasser und von Cholesterin und Urocaninsäure in Ethanol in Abhängigkeit von der Wellenlänge aufgetragen. Zu erkennen ist eine starke Absorption der endogenen Substanzen für kleinere Wellenlängen als 340 nm. Bei der Anregungswellenlänge von 355 nm ist nur eine sehr schwache Absorption für alle Stoffe zu sehen. Mit unserem Anregungssystem ist also höchstwahrscheinlich keine Anregung dieser Substanzen möglich und somit auch keine Generation von Singulett-Sauerstoff. Der Absorptionsquerschnitt von NAD beträgt bei der verwendeten Anregungswellenlänge von 355 nm $\sigma_{355\text{nm}} = (4 \pm 1) \cdot 10^{-19} \text{ cm}^2$ und $\sigma_{355\text{nm}} = (2,1 \pm 0,5) \cdot 10^{-19} \text{ cm}^2$ für NADP. Für Cholesterin beträgt der Absorptionsquerschnitt bei 355 nm $\sigma_{355\text{nm}} = (4,5 \pm 1,1) \cdot 10^{-19} \text{ cm}^2$ und für Urocaninsäure $\sigma_{355\text{nm}} = (1,7 \pm 0,4) \cdot 10^{-18} \text{ cm}^2$.

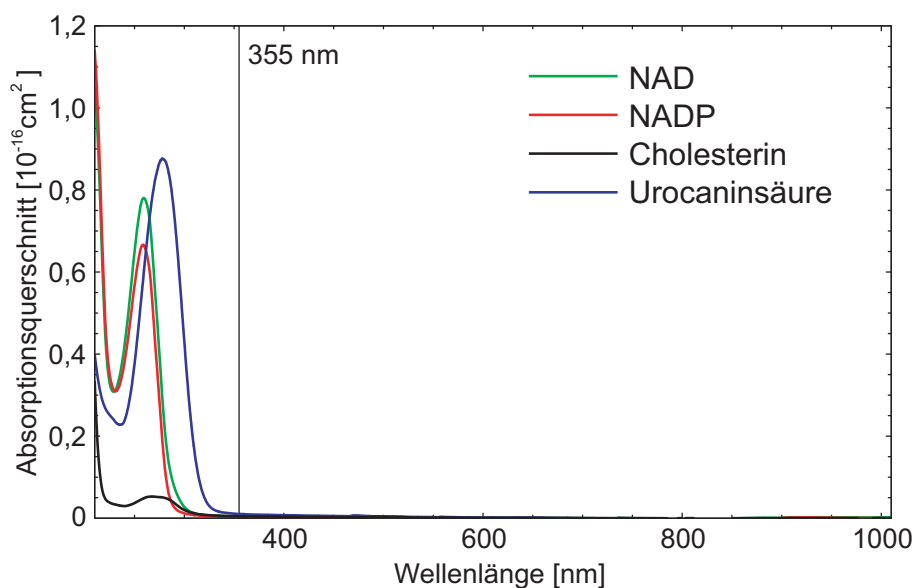


Abbildung 10.4: Absorptionsquerschnitt von NAD und NADP in Wasser und von Cholesterin und Urocaninsäure in Ethanol in Abhängigkeit von der Wellenlänge. Die untersuchten Lösungen hatten eine Konzentration von jeweils 50 μM .

10.1.3 Vergleichbare Photosensibilisatoren

Neben den endogenen Substanzen wurden als Vergleichsphotosensibilisatoren das unpolare Perinaphthenon (PN, 1H-Phenalen-1-One) und das polare sulfonisierte Perinaphthenon (PNS) verwendet. PN hat als Grundgerüst drei organische Ringe die als Phenalen bezeichnet werden. Zusätzlich ist ein Sauerstoffatom über eine Doppelbindung an ein Phenalen gebunden. In Abbildung 10.5 (a) ist die Strukturformel von PN (Reinheit 97 %, Acros Organics (Geel, Belgien)) dargestellt. Die molare Masse von PN beträgt $m_M = 180,21 \text{ g/mol}$. Die Summenformel lässt sich als $\text{C}_{13}\text{H}_8\text{O}$

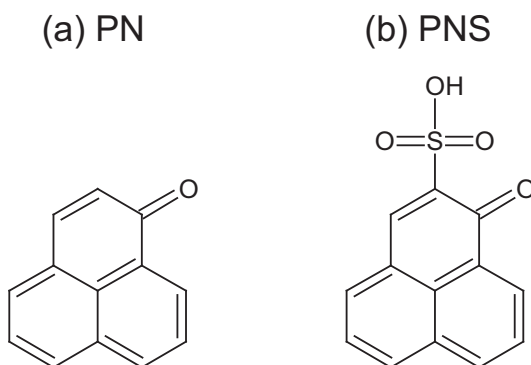


Abbildung 10.5: Strukturformel von (a) PN und (b) PNS.

se von PN beträgt $m_M = 180,21 \text{ g/mol}$. Die Summenformel lässt sich als $\text{C}_{13}\text{H}_8\text{O}$

darstellen. PN löst sich in Ethanol und nicht in Wasser. Es ist ein äußerst wirksamer und effektiver Photosensibilisator zur Erzeugung von Singulett-Sauerstoff. Die Singulett-Sauerstoff-Quantenausbeute Φ_{Δ} wird in der Literatur von $\Phi_{\Delta} = 0,93 \pm 0,08$ [MJC96] bis $\Phi_{\Delta} = 0,98 \pm 0,08$ [STD94] angegeben. Für die Triplett-Quantenausbeute wird $\Phi_{T_1} = 1$ [STD94] angenommen. Aufgrund dieser Werte eignet sich PN bestens als Vergleichsphotosensibilisator gegenüber den endogenen Substanzen.

Leider löst sich Perinaphthenon nicht in Wasser, die meisten endogenen Substanzen hingegen nur in wässriger Lösung. Durch Sulfonation von PN lässt sich PNS herstellen, welches sich in Wasser löst und vergleichbare Photosensibilisatoreigenschaften besitzt wie PN. Das Sulfonieren wurde am Institut für Organische Chemie der Universität Regensburg von Eva Engel durchgeführt. Die Strukturformel von PNS ist in Abbildung 10.5 (b) dargestellt. Die molare Masse von PNS beträgt $m_M = 260,27$ g/mol und die Summenformel lautet $C_{13}H_8O_4S$. In der Literatur wird die Singulett-Sauerstoff-Quantenausbeute Φ_{Δ} mit $\Phi_{\Delta} = 0,98 \pm 0,08$ [STD94] und mit $\Phi_{\Delta} = 0,97 \pm 0,06$ [MJC96] angegeben.

In Abbildung 10.6 ist der Absorptionsquerschnitt von PN in Ethanol und PNS in Wasser in Abhängigkeit von der Wellenlänge aufgetragen. Zu erkennen ist eine

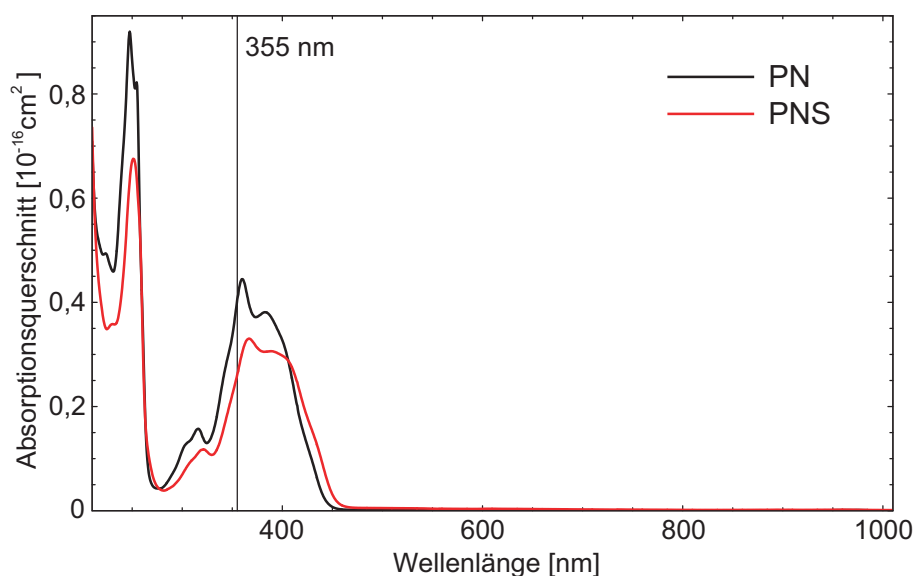


Abbildung 10.6: *Absorptionsquerschnitt von PN in Ethanol und PNS in Wasser in Abhängigkeit von der Wellenlänge. Die untersuchten Lösungen hatten eine Konzentration von jeweils 50 μ M.*

starke Absorption der Perinaphthenone für kleinere Wellenlängen als 270 nm. Im Bereich von 280 nm bis 450 nm ist ebenfalls eine Absorption zu erkennen. Das Anregungslicht (355 nm) unseres frequenzverdreifachten Nd:YAG-Lasers sollte also gut

absorbiert werden. Der Absorptionsquerschnitt von PN beträgt bei der verwendeten Anregungswellenlänge von 355 nm $\sigma_{355nm} = (4,1 \pm 0,3) \cdot 10^{-17} \text{ cm}^2$. Für PNS beträgt der Absorptionsquerschnitt bei 355 nm $\sigma_{355nm} = (2,6 \pm 0,2) \cdot 10^{-17} \text{ cm}^2$.

10.1.4 L- α -Phosphatidylcholin

Die bisher in diesem Kapitel untersuchten endogenen Substanzen zeichnen sich dadurch aus, dass sie aufgrund ihrer Struktur (als Basis dienen organische Ringe) als Typ-II-Photosensibilisator wirken können. Diese können nach Schema 3.7 über einen T_1 -Zustand Singulett-Sauerstoff generieren. Das hier untersuchte L- α -Phosphatidylcholin besitzt diese Struktur nicht und ist auf den ersten Blick nicht als Generator für Singulett Sauerstoff erkennbar. Im Abschnitt 6.1.1 ist die Strukturformel von L- α -Phosphatidylcholin dargestellt und eine abgeschätzte mittlere Molmasse von 768 g/mol abgeleitet worden.

L- α -Phosphatidylcholin löst sich nicht in Wasser und bildet dort eine Suspension. In Ethanol hingegen löst sich das Lipid sehr gut. Ethanol eignet sich deshalb bestens als Lösungsmittel für die weiteren Untersuchungen. In Abbildung 10.7 ist der Absorptionsquerschnitt von L- α -Phosphatidylcholin in Ethanol, auf Basis der mittleren Molmasse von 768 g/mol, in Abhängigkeit von der Wellenlänge aufgetragen. Zu

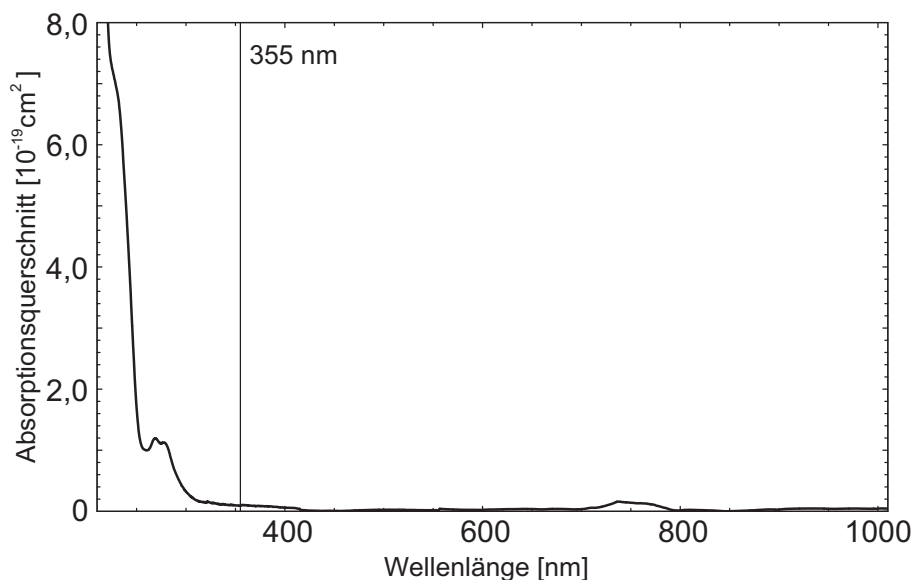


Abbildung 10.7: Absorptionsquerschnitt von L- α -Phosphatidylcholin in Ethanol in Abhängigkeit der Wellenlänge. Die untersuchte Lösung hatte eine Konzentration von 19,5 mM.

erkennen ist, dass L- α -Phosphatidylcholin ab etwa 400 nm in Richtung kürzerer Wellenlängen langsam zu absorbieren beginnt. Ab 300 nm beginnt der Absorptionsquerschnitt von Lipid in Lösung stark anzusteigen. Der Absorptionsquerschnitt bei 355 nm, der Anregungswellenlänge des frequenzverdreifachten Nd:YAG-Lasers, beträgt $(1,5 \pm 0,2) \cdot 10^{-20} \text{ cm}^2$. Trotz des kleinen Absorptionsquerschnitts bei 355 nm werden bei einer Konzentration von 15 mg/ml und einer Küvettendicke von 1 cm etwa 16 % der Laserenergie absorbiert (vgl. Gleichung (3.53)). Es wird also genügend Energie absorbiert, um eine möglich Generierung von Singulett-Sauerstoff zu gewährleisten.

10.2 Generierung von Singulett-Sauerstoff durch endogene Photosensibilisatoren

Um den Nachweis zu führen, dass die endogenen Substanzen aus Abschnitt 10.1 Singulett-Sauerstoff generieren können, wurden die Substanzen im Versuchsaufbau aus Abschnitt 4.1 untersucht. Um eine Bestrahlung mit UVA-Licht zu erreichen, wurden die Substanzen bei einer Wellenlänge von 355 nm angeregt.

10.2.1 Endogene Photosensibilisatoren in Lösung

Für alle endogenen Substanzen wurde die, für eine Konzentration von 50 μM bis hin zu 3 mM, notwendige Stoffmenge mit Hilfe einer Analysewaage (Mettler) abgewogen und die dazugehörige Menge an benötigten Lösungsmitteln mit Hilfe eines Mikropipettierers zugegeben. Um ein vollständiges Auflösen der endogenen Substanzen im Lösungsmittel zu erreichen wurden die Lösungen für eine Zeitdauer von 10 Minuten in ein Ultraschallbad (Bandelin) gestellt. Neben diesen Lösungen wurde auch das reine Lösungsmittel untersucht. Es sollte ausgeschlossen werden, dass außer den endogenen, andere Substanzen Singulett-Sauerstoff generieren. In keinem Fall konnte ein Lumineszenz-Signal durch das Lösungsmittel gefunden werden.

Für NAD und NADP in wässriger Lösung konnte, trotz der Hinweise aus der Literatur [SW96], kein Lumineszenzsignal von Singulett-Sauerstoff detektiert werden. Dieses Ergebnis war aber, aufgrund des Absorptionsspektrums (Abbildung 10.4) von NAD und NADP, erwartet worden. Das Absorptionsvermögen dieser Substanzen beginnt erst bei Wellenlängen von 320 nm und kleiner deutlich anzuwachsen. Die Generation von Singulett-Sauerstoff durch UVA ist dennoch nicht völlig auszuschließen. Einerseits decken wir mit einer Anregungswellenlänge von 355 nm nicht

den gesamten UVA-Bereich (320 - 400 nm) ab, andererseits hat unser vergleichsweise hochempfindliches Detektionssystem nur eine Quanteneffizienz von etwa 1 % (vgl. Abschnitt 4.1). Schwache Signale, verglichen mit den starken Signalen von Photosensibilisatoren in Lösungen, können unter der Detektionsgrenze unseres Systems bleiben.

Analog zu den Überlegungen zu NAD und NADP konnte auch für das Cholesterin in Ethanol kein Singulett-Sauerstoff-Lumineszenzsignal detektiert werden. Auch hier war dies aufgrund des Absorptionsspektrums (Abbildung 10.4) von Cholesterin erwartet worden.

L- α -Phosphatidylcholin in Ethanol generiert ein deutliches Singulett-Sauerstoff-Lumineszenzsignal. Die Ergebnisse dieser Messungen sollen aber erst in Abschnitt 10.2.4 behandelt werden.

Für die Flavine konnte Singulett-Sauerstoff über seine Lumineszenz direkt und eindeutig nachgewiesen werden. Im Fall der Urocaninsäure lies sich ein schwaches Signal detektieren. In Abbildung 10.8 sind exemplarische Einzelmessungen der Lumineszenz dargestellt. Das Lumineszenzsignal in (a) wurde durch 50 μ M Riboflavin in H₂O bei Luftsättigung generiert. Die Anregungsleistung betrug 100 mW bei einer Wiederholrate von 2,0 kHz. Es wurden $4 \cdot 10^4$ Durchgänge addiert. Die Anstiegszeit beträgt $\tau_1 = (2,7 \pm 0,7) \mu$ s. Die Lebensdauer von Singulett-Sauerstoff im System Riboflavin-H₂O beträgt hier $\tau_2 = (3,8 \pm 0,6) \mu$ s. Dies entspricht der bekannten Lebensdauer von Singulett-Sauerstoff in H₂O (vgl. Abschnitt 5.2).

In Abbildung 10.8 (b) wurden neben 50 μ M Riboflavin noch zusätzlich 500 μ M Natriumazid hinzugegeben. Die Anregungsleistung betrug ebenfalls 100 mW bei einer Wiederholrate von 2,0 kHz und $4 \cdot 10^4$ Durchgängen. Die Anstiegszeit lässt sich leider, aufgrund der wenigen Messpunkte im Anstieg, nicht bestimmen. Die Lebensdauer vom Singulett-Sauerstoff verkürzt sich auf $\tau_2 = (1,8 \pm 0,3) \mu$ s.

Neben der definierten Lebensdauer von Singulett-Sauerstoff in H₂O und dem Verkürzen der Lebensdauer durch Natriumazid wurde noch ein weiterer Nachweis für die Zuordnung des Signals bei 1269 nm zu Singulett-Sauerstoff geführt (vgl. Abschnitt 5.3.1). In Abbildung 10.9 ist das Lumineszenzspektrum von Singulett-Sauerstoff zu sehen. Als Lösung wurde 50 μ M Riboflavin in H₂O verwendet. Die einzelnen Messungen (dargestellt als Rechtecke) wurden zeitaufgelöst aufgenommen. Die Signale wurden dann numerisch über die Zeit integriert und das Integral gegen die Wellenlänge bzw. Photonenenergie aufgetragen. Das Wellenlängenspektrum der luftgesättigten Lösung zeigt eine deutliche Ausprägung bei $\lambda = 1269$ nm, welche der Lumineszenz von Singulett-Sauerstoff zugeordnet werden kann.

Das Signal, das durch die Urocaninsäure generiert wurde, ist in Abbildung 10.8 (c)

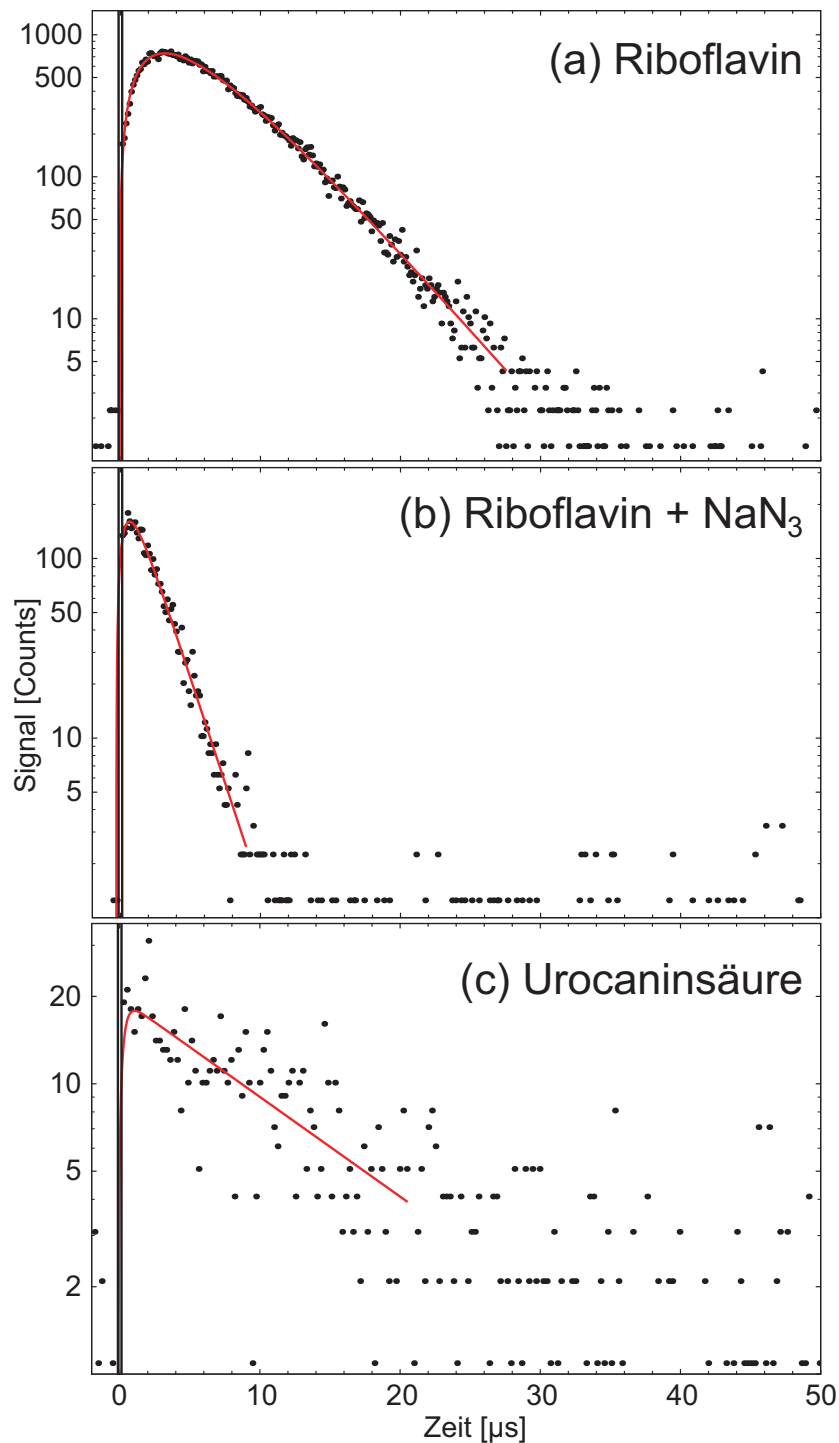


Abbildung 10.8: Singulett-Sauerstoff-Lumineszenzsignal generiert durch (a) 50 μM Riboflavin, (b) 50 μM Riboflavin mit 0,5 mM Natriumazid gelöst in H_2O und (c) 3 mM Urocaninsäure gelöst in Ethanol.

zu sehen. Zur Signalverbesserung wurde eine höhere Konzentration von 3 mM Urocaninsäure in Ethanol gewählt. Die Anregungsleistung betrug 100 mW bei ei-

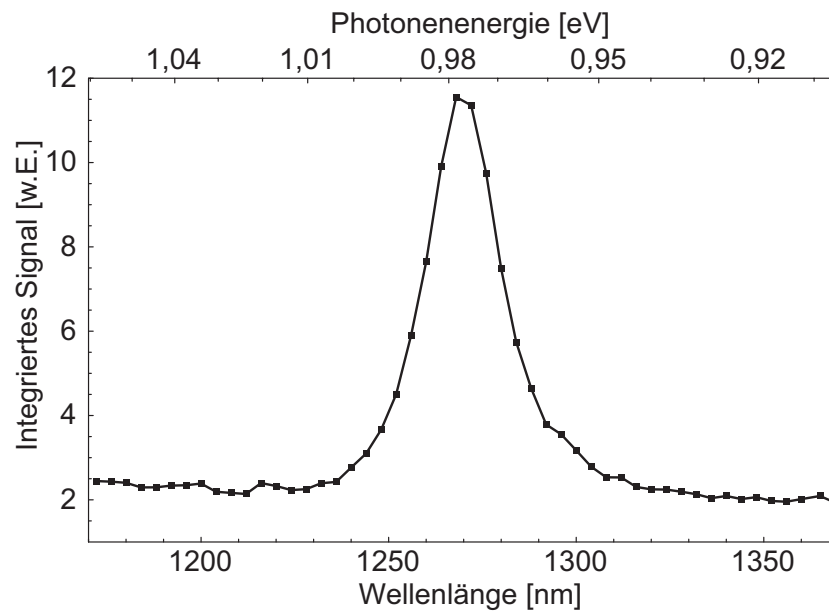


Abbildung 10.9: Lumineszenzspektrum von Singulett-Sauerstoff, generiert durch 50 μM Riboflavin in H_2O bei Luftsättigung.

ner Wiederholrate von 2,0 kHz und $1 \cdot 10^5$ Durchgängen. Die Anstiegszeit lässt sich auch hier aufgrund der wenigen Messpunkte im Anstieg nicht bestimmen. Die Lebensdauer von Singulett-Sauerstoff kann zu $\tau_2 = (13 \pm 4) \mu\text{s}$ bestimmt werden. Diese Lebensdauer deutet darauf hin, dass es sich um Singulett-Sauerstoff handelt, denn dieser lebt in Ethanol etwa 13 μs [WHR95]. Durch Hinzugabe von Natriumazid konnte ein Verschwinden des schwachen Signals beobachtet werden. Auch dies deutet darauf hin, dass es sich hier um die Lumineszenz von Singulett-Sauerstoff handelt. Trotz des schwachen Lumineszenzsignals kann also die Annahme in der Literatur [HS98], dass Urocaninsäure Singulett-Sauerstoff unter UVA-Licht generiert, mit großer Wahrscheinlichkeit bestätigt werden.

10.2.2 Riboflavin in Lösung

In diesem Abschnitt sollen, analog zu Abschnitt 3.6, die Raten und Ratenkonstanten für Riboflavin in Wasser ermittelt werden.

10.2.2.1 Variation der Sauerstoff-Konzentration

Im Rahmen dieser Experimente wurde in H_2O eine Riboflavin-Konzentration von $50 \mu M$ verwendet. Die Sauerstoff-Konzentration wurde von $10 \mu M$ bis zu $270 \mu M$ variiert. Abbildung 10.10 zeigt die Anstiegs- und Abklingraten der Singulett-Sauerstoff-Lumineszenz in Abhängigkeit von der Sauerstoff-Konzentration. Da in-

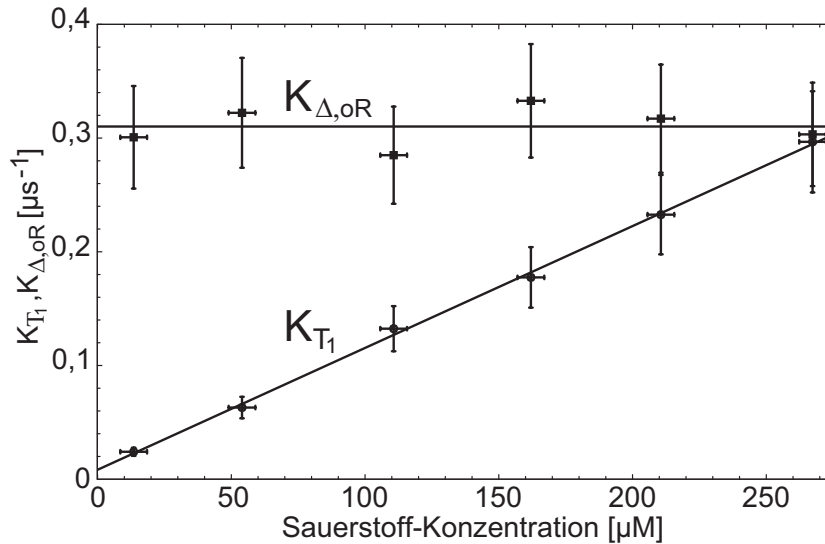


Abbildung 10.10: Anstiegs- und Abklingraten der Lumineszenz von Singulett-Sauerstoff, generiert von $50 \mu M$ Riboflavin in H_2O , versus der Sauerstoff-Konzentration.

nerhalb der Messgenauigkeit keine Aufspaltung zu erkennen ist, kann die Rückkopplung vernachlässigt werden ($k_{\Delta T_1} = 0$, vgl. Abschnitt 3.5). Die Anstiegs- (β_1) und Abklingraten (β_2) können deshalb nach Gleichung (3.20) unten, $K_{\Delta,OR}$ und K_{T_1} gleichgesetzt werden. $K_{\Delta,OR}$ lässt sich nach Abbildung 10.10 bestimmen zu $K_{\Delta,OR} = k_{\Delta} + k_{\Delta S_0}[P] = (0,31 \pm 0,05) \mu s^{-1}$ und K_{T_1} lässt sich bestimmen zu $K_{T_1} = k_{T_1} + (k_{T_1 O_2} + k_{T_1 \Delta})[O_2] + k_{T_1 S_0}[P] = (0,008 \pm 0,002) \mu s^{-1} + (0,0011 \pm 0,0003) \mu s^{-1} \mu M^{-1} [O_2]$. Somit entspricht $k_{T_1 O_2} + k_{T_1 \Delta} = (0,0011 \pm 0,0003) \mu s^{-1} \mu M^{-1}$ der Steigung des Fits bzw. der Ratenkonstanten für die Deaktivierung des Riboflavin- T_1 -Zustandes durch molekularen Sauerstoff. Weiter lässt sich ermitteln, dass $k_{T_1} + k_{T_1 S_0}[P] = (0,008 \pm 0,002) \mu s^{-1}$ gilt. Dies entspricht dem Achsenabschnitt bei $[O_2] = 0$.

10.2.2.2 Variation der Riboflavin-Konzentration

Im Rahmen dieser Experimente wurden in H_2O eine Riboflavin-Konzentrationen von $10 \mu M$ bis $100 \mu M$ verwendet. Die Sauerstoff-Konzentration betrug $[O_2] = 160$

$\pm 7 \mu\text{M}$. Dies bedeutet, dass es sich um eine 60 % luftgesättigte Lösung handelte. Abbildung 10.11 zeigt die Anstiegs- und Abklingraten der Singulett-Sauerstoff-Lumineszenz in Abhängigkeit von der Riboflavin-Konzentration. Erhöht man die

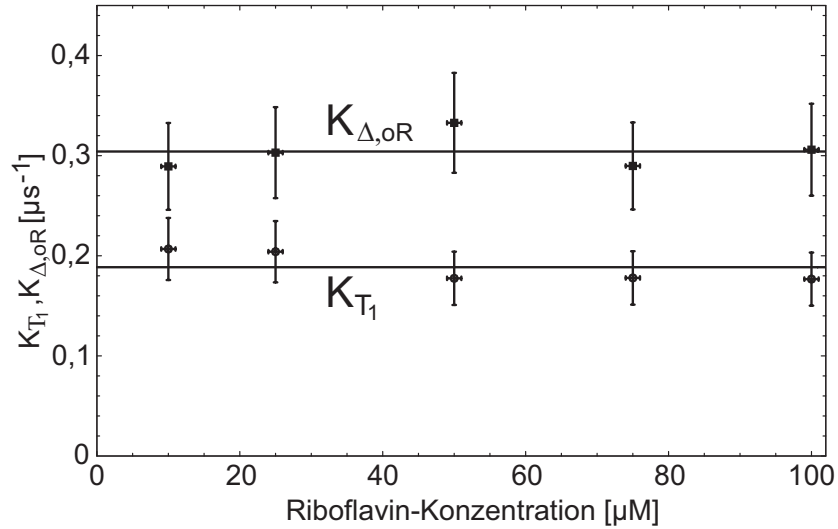


Abbildung 10.11: Anstiegs- und Abklingraten der Lumineszenz von Singulett-Sauerstoff, generiert von Riboflavin in H_2O , versus der Riboflavin-Konzentration bei 60 % Luftsättigung.

Riboflavin-Konzentration in H_2O von $10 \mu\text{M}$ bis zu $100 \mu\text{M}$, so bleibt die Relaxationsrate K_{T_1} des Triplett- T_1 -Zustandes von Riboflavin, innerhalb des experimentellen Fehlers, mit $K_{T_1} = (0,19 \pm 0,03) \mu\text{s}^{-1}$ konstant. Nach Gleichung (3.17) bedeutet dies, dass die Ratenkonstante $k_{T_1 S_0} = 0$ ist. Dies hat zur Folge, dass k_{T_1} nach Abbildung 10.10 eindeutig zu $k_{T_1} = (0,008 \pm 0,002) \mu\text{s}^{-1}$ zu bestimmen ist. Dies entspricht einer Triplett-Lebensdauer von Riboflavin von $\tau_{T_1} = 1/k_{T_1} = (130 \pm 30) \mu\text{s}$.

Wie in Abbildung 10.11 zu sehen ist, bleibt die Relaxationsrate $K_{\Delta, oR}$ des Singulett-Sauerstoffs ebenfalls mit der Riboflavin-Konzentration konstant. $K_{\Delta, oR}$ lässt sich zu $K_{\Delta, oR} = (0,31 \pm 0,05) \mu\text{s}^{-1}$ bestimmen. Da in der hier gezeigten Messung kein Quenchen durch Riboflavin vorhanden ist, lässt sich nach Gleichung (3.17) $k_{\Delta S_0} = 0$ setzen. Berücksichtigt man wieder Abbildung 10.10, lässt sich die Ratenkonstante k_{Δ} zu $k_{\Delta} = (0,31 \pm 0,05) \mu\text{s}^{-1}$ bestimmen. Somit beträgt die hier ermittelte Singulett-Sauerstoff-Lebensdauer in H_2O $\tau_{\Delta} = 1/k_{\Delta} = (3,2 \pm 0,5) \mu\text{s}$.

10.2.3 Singulett-Sauerstoff-Quantenausbeute Φ_{Δ} der Flavine

Um zweifelsfrei den Beweis zu führen, dass UVA-Schäden im Gewebe von Singulett-Sauerstoff stammen können, ist es notwendig, dass die endogenen Photosensibi-

lisatoren Singulett-Sauerstoff mit einer gewissen Effizienz generieren. Die Effizienz der Singulett-Sauerstoff-Erzeugung wird durch die Singulett-Sauerstoff-Quantenausbeute Φ_{Δ} beschrieben.

In der Haut ist der Sauerstoffdruck kleiner als 20 mmHg Quecksilbersäule (Gesicht, [BES87]). Dies entspricht etwa einer Konzentration von 36 μM an Sauerstoff in Lösung. Bei Luftsättigung beträgt der Sauerstoffdruck in wässriger Lösung etwa 150 mmHg Quecksilbersäule bzw. 270 μM . Deshalb ist es notwendig die Singulett-Sauerstoff-Quantenausbeute Φ_{Δ} auch bei niedrigen Sauerstoff-Konzentrationen zu bestimmen.

10.2.3.1 Direkte Bestimmung von Φ_{Δ} am Beispiel Riboflavin

Nach Gleichung (3.38) lässt sich die Singulett-Sauerstoff-Quantenausbeute Φ_{Δ} direkt bestimmen. Aus der Literatur ist die Triplett-Quantenausbeute für Riboflavin in H_2O bekannt zu $\Phi_{T_1} = 0,61$ [CMS88] und $\Phi_{T_1} = 0,375 \pm 0,05$ [IPH03]. Der Anteil $f_{\Delta}^{T_1}$ an T_1 -Zuständen, die durch die Wechselwirkung mit Sauerstoff deaktiviert werden und dabei Singulett-Sauerstoff erzeugen, liegt zwischen 0,25 und 1 [SS01], abhängig von der Triplett-Energie E_{T_1} und der Polarität des Lösungsmittels. Mit den Raten K_{T_1} und $k_{T_1\Delta} + k_{T_1\text{O}_2}$, welche in Abschnitt 10.2.2 bestimmt worden sind, lässt sich P_{T_1} , der Anteil der T_1 -Zustände die durch die Wechselwirkung mit Sauerstoff relaxieren (siehe Gleichung (3.41)), ermitteln.

In Abbildung 10.12 ist der Verlauf von Φ_{Δ} und P_{T_1} in Abhängigkeit von der Sauerstoffkonzentration dargestellt. P_{T_1} beginnt für $[\text{O}_2]$ bei 0 und steigt bei zunehmender Sauerstoff-Konzentration an. Für $[\text{O}_2] \rightarrow \infty$ nähert sich $P_{T_1} = 1$ an. Die einzelnen Werte wurden auf Basis der Messwerte von Abbildung 10.10 berechnet.

Da sowohl Φ_{T_1} als auch $f_{\Delta}^{T_1}$ nicht eindeutig bekannt sind, lässt sich der Verlauf der Singulett-Sauerstoff-Quantenausbeute Φ_{Δ} nur für den schraffierten Bereich (Abbildung 10.12) angeben. $\Phi_{\Delta, \text{max}}$ entspricht dabei dem Verlauf der maximalen Singulett-Sauerstoff-Quantenausbeute, welche mit der Triplett-Quantenausbeute $\Phi_{T_1} = 0,61$ und $f_{\Delta}^{T_1} = 1$ bestimmt wurde. Für $\Phi_{\Delta, \text{min}}$ wurde die Triplett-Quantenausbeute $\Phi_{T_1} = 0,375$ verwendet und für $f_{\Delta}^{T_1}$ wurde $f_{\Delta}^{T_1} = 0,25$ angenommen. Der Verlauf von Φ_{Δ} entspricht dem Verlauf von P_{T_1} , reduziert um die Faktoren Φ_{T_1} und $f_{\Delta}^{T_1}$. Bei Luftsättigung (270 μM) variiert Φ_{Δ} von $0,59 \pm 0,05$ bis $0,09 \pm 0,02$. Bei einer Sauerstoff-Konzentration von 36 μM beträgt die Singulett-Sauerstoff-Quantenausbeute Φ_{Δ} von Riboflavin $0,50 \pm 0,04$ im Maximum und $0,07 \pm 0,02$ im Minimum.

Leider ist eine genauere Bestimmung von Φ_{Δ} , bezüglich Riboflavin nicht direkt

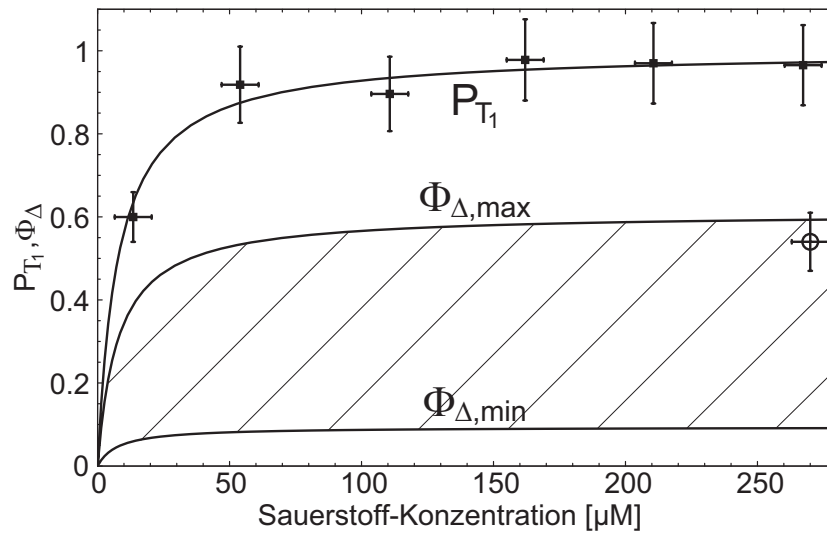


Abbildung 10.12: Singulett-Sauerstoff-Quantenausbeute Φ_{Δ} und P_{T_1} von Riboflavin in H_2O versus der Sauerstoff-Konzentration. Schwarze Rechtecke: Einzelne Messungen zu P_{T_1} . Kreis: Φ_{Δ} indirekt bestimmt nach Abschnitt 10.2.3.2.

möglich. Deshalb soll im folgenden Abschnitt Φ_{Δ} indirekt bestimmt werden.

10.2.3.2 Indirekte Bestimmung von Φ_{Δ}

Mit Hilfe eines bekannten Photosensibilisators mit bekannter Singulett-Sauerstoff-Quantenausbeute Φ_{Δ} ist es möglich, Φ_{Δ} des unbekannten Photosensibilisators, über einen Vergleich der Lumineszenzenenergien, zu bestimmen (vgl. Abschnitt 3.7.2). Dazu muss für beide Photosensibilisatoren die Energie der Lumineszenz (Integral des Lumineszenzsignals über die Zeit) bei unterschiedlicher absorbierter Laserleistung bestimmt werden. Das Verhältnis der Steigungen der Energie der Lumineszenz gegen die absorbierte Laserenergie ist dann gleich dem Verhältnis der Singulett-Sauerstoff-Quantenausbeuten (siehe Gleichung (3.52)).

In Abbildung 10.13 ist die Energie der Lumineszenz gegen die absorbierte Laserenergie für PNS und verschiedene Flavine aufgetragen. Der absorbierte Anteil des Laserlichtes (siehe Tabelle 10.1 dritte Spalte) bei einer 1 cm dicken Küvette lässt sich mit Gleichung (3.54) bestimmen. Für alle verwendeten Substanzen wurde das Lösungsmittel H_2O verwendet und jeweils $4 \cdot 10^4$ Durchgänge addiert. Die Referenzsubstanz PNS, sowie Riboflavin, FMN und FAD wurden bei einer Konzentration von jeweils $50 \mu M$ bei Luftsättigung untersucht.

In Tabelle 10.1 sind die Ergebnisse der Bestimmung der Singulett-Sauerstoff-Quantenausbeute Φ_{Δ} zusammengefasst. In der ersten Spalte sind die verwendeten Photo-

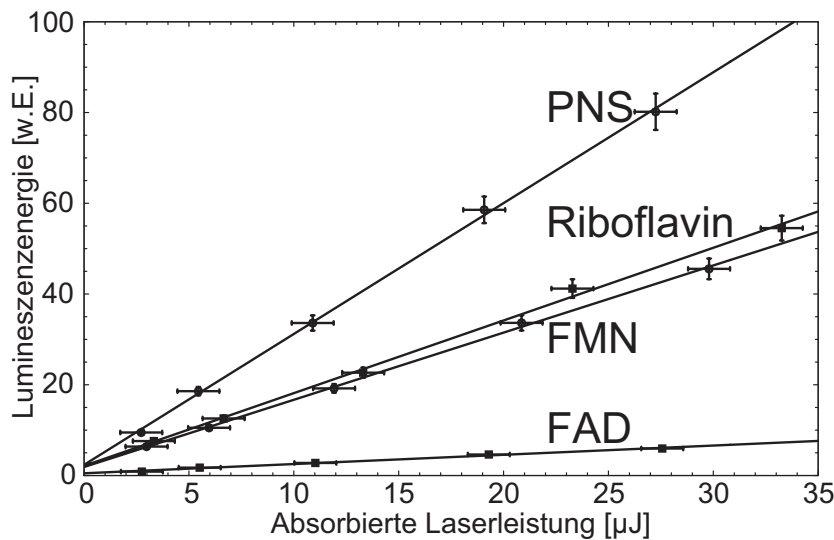


Abbildung 10.13: Lumineszenzenergie von PNS, Riboflavin, FMN und FAD versus der absorbierten Laserenergie. Die untersuchten Lösungen hatten eine Konzentration von jeweils 50 μM .

sensibilisatoren aufgeführt. Die zweite Spalte gibt den Absorptionsquerschnitt der einzelnen Photosensibilisatoren bei 355 nm in H_2O an. Aus dem Absorptionsquerschnitt lässt sich mit Gleichung (3.54) der absorbierte Anteil des Laserlichtes bei einer 1 cm dicken Küvette bestimmen. Dieser Wert bei einer 50 μM -Lösung ist für jeden Photosensibilisator in der dritten Spalte dargestellt. Die absorbierte Laserenergie lässt sich aus der tatsächlich im Experiment verwendeten Laserenergie, multipliziert mit den Werten der dritten Spalte, geteilt durch 100 %, berechnen. Die Steigungen der Graphen aus Abbildung 10.13, sind in der vierten Spalte von Tabelle 10.1 zu sehen. Nach Gleichung (3.52) ist das Verhältnis der Steigungen der Geraden (Energie der Lumineszenz gegen die absorbierte Laserenergie) der einzelnen Photosensibilisatoren dabei gleich dem Verhältnis der Singulett-Sauerstoff-Quantenausbeute Φ_Δ der jeweiligen Photosensibilisatoren. Somit lässt sich Φ_Δ , ausgehend vom bekannten Φ_Δ von PNS [STD94], für jedes Flavin bestimmen. Diese so bestimmten Singulett-Sauerstoff-Quantenausbeuten Φ_Δ sind in der fünften Spalte zu sehen. Es fällt auf, dass mit zunehmender Komplexität der Struktur der Flavine (vgl. Abbildung 10.1) Φ_Δ kleiner wird, d.h. die Fähigkeit Singulett-Sauerstoff zu generieren abnimmt. Die Singulett-Sauerstoff-Quantenausbeuten der endogenen Flavine, insbesondere die von Riboflavin und FMN, sind sehr beachtlich. Im Vergleich dazu hat Photofrin, welches zum Abtöten von Krebszellen eingesetzt wird, bei Luftsättigung nur eine Singulett-Sauerstoff-Quantenausbeute von 0,35 [OCO02].

Vergleichen wir nun die erhaltenen Werte mit den Ergebnissen aus Abschnitt 10.2.3.1.

Photo-sensibilisator 50 μM in H_2O	Absorptionsquerschnitt bei 355 nm in 10^{-17}cm^2	Absorption bei 1 cm Küvetten- dicke [%]	Steigung $S([\text{O}_2])$ in w.E.	Φ_Δ
PNS	$2,6 \pm 0,2$	54 ± 4	$0,29 \pm 0,03$	$0,98 \pm 0,08^a$
Riboflavin	$3,6 \pm 0,2$	66 ± 5	$0,16 \pm 0,02$	$0,54 \pm 0,07$
FMN	$3,0 \pm 0,2$	59 ± 4	$0,15 \pm 0,02$	$0,51 \pm 0,07$
FAD	$2,7 \pm 0,2$	56 ± 4	$0,020 \pm 0,002$	$0,07 \pm 0,01$

Tabelle 10.1: Daten zur indirekten Bestimmung der Singulett-Sauerstoff-Quantenausbeute Φ_Δ von Riboflavin, FMN und FAD im Vergleich zu PNS. ^a [STD94].

Für Riboflavin wurde in Abbildung 10.12 die indirekt bestimmte Singulett-Sauerstoff-Quantenausbeute bei $[\text{O}_2] = 270 \mu\text{M}$ eingezeichnet. Für $\Phi_{T_1} = 0,61$ und $f_\Delta^{T_1} = 1$ konnte Φ_Δ von Riboflavin bei Luftsättigung direkt zu $\Phi_\Delta^{\text{direkt}} = 0,59 \pm 0,04$ bestimmt werden. In diesem Abschnitt wurde Φ_Δ indirekt zu $\Phi_\Delta^{\text{indirekt}} = 0,54 \pm 0,07$ bestimmt. Dieser Vergleich zeigt, dass eine Triplett-Quantenausbeute von etwa 0,61 und $f_\Delta^{T_1} = 1$ ($k_{T_1\text{O}_2} = 0$) innerhalb der Messgenauigkeit realistische Werte darstellen. Hingegen scheint die Triplett-Quantenausbeute $\Phi_{T_1} = 0,375 \pm 0,05$ zu niedrig zu sein.

Die Berücksichtigung des ansteigenden Verlaufs der Singulett-Sauerstoff-Quantenausbeute mit der Sauerstoff-Konzentration ist wichtig. So ist Φ_Δ von Riboflavin bei einer Sauerstoff-Konzentration von $36 \mu\text{M}$, wie sie in der Haut herrscht, mit $\Phi_\Delta^{\text{direkt}} = 0,50 \pm 0,04$ kleiner als bei Luftsättigung $\Phi_\Delta^{\text{direkt}} = 0,59 \pm 0,04$. Jedoch ist dies noch ausreichend um genügend Singulett-Sauerstoff in der Haut zu generieren. Zusätzlich ist zu beachten, dass Photosensibilisatoren wie Riboflavin neben Singulett-Sauerstoff (Typ-II-Reaktion) auch Sauerstoff-Radikale (Typ-I-Reaktion) generieren (vgl. Abschnitt 3.2). Fällt die Sauerstoff-Konzentration fällt auch Φ_Δ und somit die Effizienz der Singulett-Sauerstoff-Generierung. Folglich steigt der Anteil der Generierung von Sauerstoff-Radikalen nach der Typ-I-Reaktion an. Genau das wurde im Paper von Minami *et al.* [MSM99] beobachtet. Unter wenig Sauerstoff produziert Riboflavin mehr toxische Stoffe wie z.B. H_2O_2 als bei Luftsättigung.

10.2.4 L- α -Phosphatidylcholin in Lösung

Betrachten wir nun die Ergebnisse von L- α -Phosphatidylcholin in Ethanol unter Bestrahlung mit Laserlicht bei 355 nm. In Abbildung 10.14 ist das dabei detektier-

te Lumineszenzsignal von Singulett-Sauerstoff zu sehen. Das Lumineszenzsignal

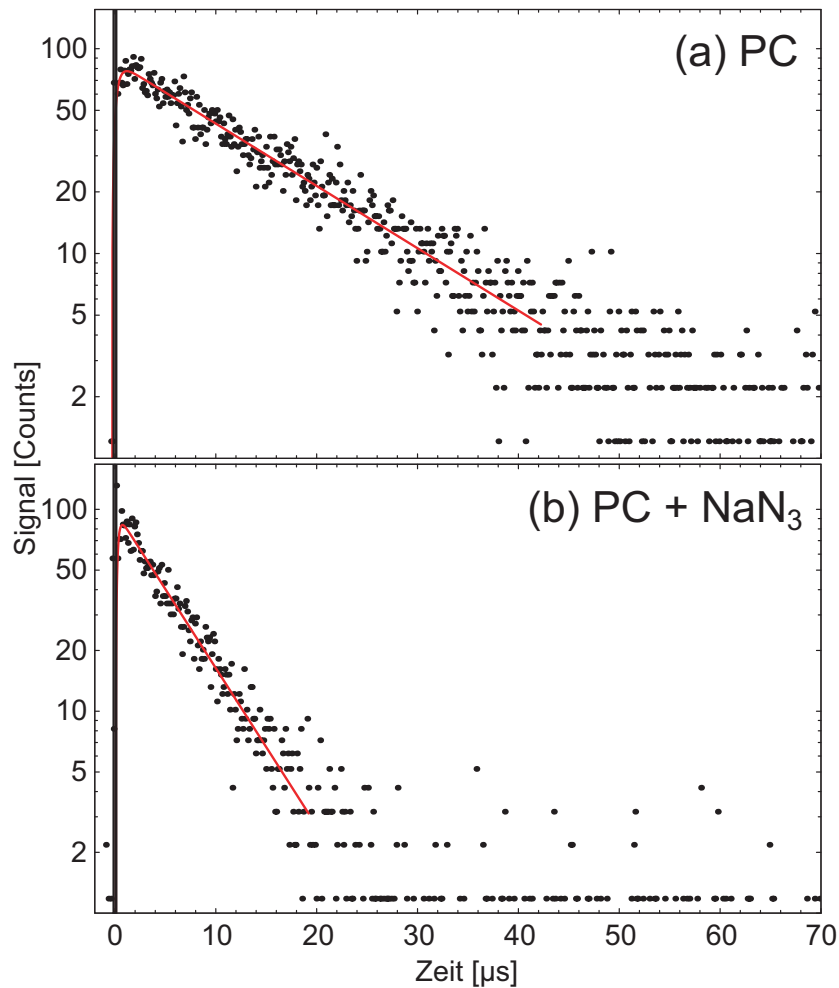


Abbildung 10.14: Singulett-Sauerstoff-Lumineszenzsignal generiert durch (a) 15 mg/ml L- α -Phosphatidylcholin und (b) 15 mg/ml L- α -Phosphatidylcholin mit 250 μ M Natriumazid gelöst in EtOH.

in (a) wurde durch 15 mg/ml L- α -Phosphatidylcholin in EtOH bei Luftsättigung generiert. Die Anregungsleistung betrug 100 mW bei 355 nm und einer Wiederholrate von 2,0 kHz. Es wurden $4 \cdot 10^4$ Durchgänge addiert. Die Anstiegszeit konnte aufgrund der sehr wenigen Messpunkte im Anstieg nicht bestimmt werden. Die Abklingdauer und somit die Lebensdauer von Singulett-Sauerstoff im System L- α -Phosphatidylcholin-EtOH beträgt hier $\tau_2 = (14 \pm 2) \mu\text{s}$. Diese Lebensdauer entspricht der typischen Lebensdauer von Singulett-Sauerstoff in Ethanol (13 μs [WHR95]).

In Abbildung 10.14 (b) wurden neben 15 mg/ml L- α -Phosphatidylcholin noch zusätzlich 250 μ M Natriumazid hinzugegeben. Die Anregungsleistung betrug ebenfalls 100 mW bei einer Wiederholrate von 2,0 kHz und $4 \cdot 10^4$ Durchgängen. Die Anstiegszeit lässt sich ebenfalls nicht bestimmen. Die Lebensdauer von Singulett-Sauerstoff

verkürzt sich auf $\tau_2 = (5,5 \pm 0,8) \mu\text{s}$.

Neben der definierten Lebensdauer von Singulett-Sauerstoff in EtOH und dem Verkürzen der Lebensdauer durch Natriumazid wurde noch ein Lumineszenzspektrum als weiterer Nachweis für die Zuordnung des Signals zum Singulett-Sauerstoff aufgenommen. Hier zeigt sich eine deutliche Ausprägung des Lumineszenzspektrums bei 1269 nm und somit die eindeutige Zuordnung des Signals zu Singulett-Sauerstoff (nicht dargestellt).

Aufgrund der Struktur bleibt aber die Frage wie Singulett-Sauerstoff von L- α -Phosphatidylcholin erzeugt wird. Bisher ist nicht bekannt, ob L- α -Phosphatidylcholin ein Triplett-Niveau besitzt und damit Singulett-Sauerstoff erzeugen kann. Alle bisher verwendeten Photosensibilisatoren zeigen, anders als L- α -Phosphatidylcholin, eine typische organische Ringstruktur die zu einem Triplett-Niveau führt. Alternativ kann Singulett-Sauerstoff auch chemisch über die Typ-I-Reaktion erzeugt werden (vgl. Abschnitt 3.2). Um dies zu überprüfen, wurden Typ-I-Quencher eingesetzt. Mannitol (Zuckeraustauschstoff, Reinheit > 99 %, Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)) wird eingesetzt um Hydroxylradikale (OH^\cdot) zu deaktivieren und Superoxiddismutase (SOD, Enzym der eukaryotische Zelle, Reinheit > 99 %, Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)) um Superoxidanione (O_2^-) zu deaktivieren. In Tabelle 10.2 sind die Ergebnisse zusammengefasst. In der ersten Spalte sind die verwen-

Photosensibilisator in EtOH	Typ-I-Quencher	Absorptionsquerschnitt bei 355 nm in 10^{-17}cm^2	Absorption bei 1 cm Küvetten-dicke [%]	Lumineszenzenergie [w.E.]
50 μM PN	-	$4,1 \pm 0,3$	71 ± 5	13700
50 μM PN	Mannitol	$4,1 \pm 0,3$	71 ± 5	14300
50 μM PN	SOD	-	-	15200
15 mg/ml PC	-	$(1,5 \pm 0,2) \cdot 10^{-3}$	16 ± 1	2200
15 mg/ml PC	Mannitol	$(1,4 \pm 0,2) \cdot 10^{-3}$	15 ± 1	910
15 mg/ml PC	SOD	-	-	660

Tabelle 10.2: Lumineszenzenergie von PN und L- α -Phosphatidylcholin (PC) in EtOH, jeweils mit und ohne Typ-I-Quencher. Für die Lumineszenzenergie ist ein Fehler von 15 % anzunehmen.

deten Photosensibilisatoren zu sehen. Neben L- α -Phosphatidylcholin wurde auch Perinaphthenon (PN), als Vergleichssubstanz, untersucht. PN hat eine Singulett-Sauerstoff-Quantenausbeute Φ_Δ die annähernd 1 ist (vgl. Abschnitt 10.1.3). Deshalb

sollte die Typ-I-Reaktion keine Rolle spielen und die Quencher sollten keinen Einfluss auf das erzeugte Lumineszenzsignal haben.

In der zweiten Spalte sind die eingesetzten Typ-I-Quencher zu sehen. Für Mannitol wurde eine Konzentration von 1 mM gewählt. Bei SOD wurde 1 mg/ml verwendet. Die dritte Spalte gibt den Absorptionsquerschnitt der einzelnen Photosensibilisatoren mit bzw. ohne Quencher bei 355 nm in EtOH an. Aus dem Absorptionsquerschnitt lässt sich mit Gleichung (3.54) der absorbierte Anteil des Laserlichtes bei einer 1 cm dicken Küvette bestimmen. Dieser Wert ist für jedes untersuchte System in der dritten Spalte dargestellt. Für SOD konnte kein Absorptionsquerschnitt bestimmt werden, da es sich nicht vollständig in EtOH löst. Zumindest für Mannitol ist sichtbar, dass der Quencher auf die Absorption im Rahmen der Messgenauigkeit keinen Einfluss hat.

In der fünften Spalte ist die gemessene Lumineszenzenergie aufgetragen. Jedes System wurde dabei mit $4 \cdot 10^4$ Schuss bei 100 mW untersucht. Für PN bleibt die Lumineszenzenergie im Rahmen der Messgenauigkeit konstant. Die Typ-I-Quencher haben also keinen Einfluss auf die Erzeugung von Singulett-Sauerstoff durch PN. Die Typ-I-Reaktion spielt wie erwartet für diesen Fall keine Rolle. Für L- α -Phosphatidylcholin sieht das anders aus. Durch den Einsatz der Typ-I-Quencher verringert sich die Lumineszenzenergie deutlich. Durch Mannitol fällt die Lumineszenzenergie von 2200 auf 910. Bei SOD ist es noch deutlicher. Hier fällt die Lumineszenzenergie von 2200 auf 660. Die Lebensdauer von Singulett-Sauerstoff hingegen blieb für alle untersuchten Systeme konstant bei etwa 14 μ s. Das bedeutet aber, dass die Erzeugung von Singulett-Sauerstoff unterbunden wurde. Damit kann der Verdacht, dass es sich hier bei der Erzeugung von Singulett-Sauerstoff hauptsächlich um eine chemische Erzeugung über die Typ-I-Reaktion handelt, bestätigt werden.

Um aber den Mechanismus der Erzeugung von Singulett-Sauerstoff durch L- α -Phosphatidylcholin besser zu verstehen, sind noch weitere Untersuchungen notwendig. Da es sich hier um ein Gemisch und keine Reinsubstanz handelt, sollten z.B. die einzelnen Bestandteile von L- α -Phosphatidylcholin getrennt untersucht werden. Außerdem sollte noch eine Variation der Quencher-Konzentration durchgeführt werden, um genauere Kenntnisse über die Wirkung der Quencher zu erfahren.

10.2.5 Zellen in Lösung

Aufgrund der vorhergehenden Untersuchungen zu endogenen Photosensibilisatoren ist es durchaus denkbar, dass durch Bestrahlung mit UVA-Licht auch in lebenden

Zellen Singulett-Sauerstoff detektiert werden kann. In den Kapiteln 7 und 8 wurde bereits Singulett-Sauerstoff in lebenden Zellen detektiert. Dort wurde ein exogener Photosensibilisator in die Zellen eingebracht, der unter Bestrahlung mit Laserlicht bei 532 nm Singulett-Sauerstoff erzeugte. Ohne diesen Photosensibilisator konnte kein Singulett-Sauerstoff detektiert werden. Die Ursache liegt sicherlich in der Anregungswellenlänge von 532 nm, bei der kein endogener Photosensibilisator ausreichend absorbiert, so dass kein Singulett-Sauerstoff erzeugt werden kann. Dies sollte sich aber mit dem Einsatz von UVA-Licht bei 355 nm ändern.

Untersucht wurden die bekannten HT29-Zellen und sog. NHEK-Zellen. Diese epidermalen Keratinozyten sind deshalb von Bedeutung, weil es sich um Zellen aus der Haut handelt, die dem täglichen UVA-Licht der Sonne ausgesetzt sind. Die Zellen wurden, wie in Abschnitt 7.1.2 vorgestellt, gezüchtet und ohne zusätzlichen exogenen Photosensibilisator bei einer Konzentration von $1 \cdot 10^6$ Zellen pro Milliliter untersucht. In Abbildung 10.15 sind die Ergebnisse dargestellt. Es wurden jeweils zehn Proben mit $8 \cdot 10^4$ Schuss bei einer Wellenlänge von 355 nm bestrahlt. Die Wiederholrate betrug 2,0 kHz bei einer Laserleistung von 150 mW. Die Ergebnisse der einzelnen Messungen wurden dann summiert, um das Signal-Rausch-Verhältnis zu verbessern.

Abbildung 10.15 (a) zeigt das Lumineszenzsignal von Singulett-Sauerstoff generiert durch HT29-Zellen in H_2O . Die Anstiegszeit konnte aufgrund des schwachen Signals nicht bestimmt werden. Die Abklingdauer und somit die Lebensdauer von Singulett-Sauerstoff beträgt $\tau_2 = (5 \pm 1) \mu s$. Bei den NHEK-Zellen (b) ist ein ähnliches Signal zu sehen. Auch hier beträgt die Lebensdauer von Singulett-Sauerstoff $\tau_2 = (5 \pm 1) \mu s$. Es scheint also kein Unterschied zwischen den verwendeten Zelltypen zu bestehen. Als Test, dass es sich hier wirklich um das Lumineszenzsignal von Singulett-Sauerstoff handelt, wurde zu den Zell-Suspensionen jeweils 50 mM Natriumazid hinzugegeben. In Abbildung 10.15 (c) ist dies für die NHEK-Zellen zu sehen. Das Signal verschwindet fast vollständig, so dass keine Lebensdauer von Singulett-Sauerstoff mehr bestimmt werden kann.

Es fällt auf, dass das Lumineszenzsignal von Zellen bei UVA-Bestrahlung generell sehr schwach ist. Dies ist aber nicht weiter verwunderlich, da die Zelle über Abwehrmechanismen gegenüber Singulett-Sauerstoff verfügt. Dieser wird beispielsweise durch Proteine in der Zelle deaktiviert. Andererseits war eine stärkere Generierung von Singulett-Sauerstoff in Zellen durch UVA-Licht nicht zu erwarten. Dies wäre sicherlich schädlich für die Zelle und der Mensch wäre wesentlich empfindlicher gegenüber Sonnenlicht.

Weiter fällt auf, dass die Lebensdauer von Singulett-Sauerstoff in HT29-Zellen mit

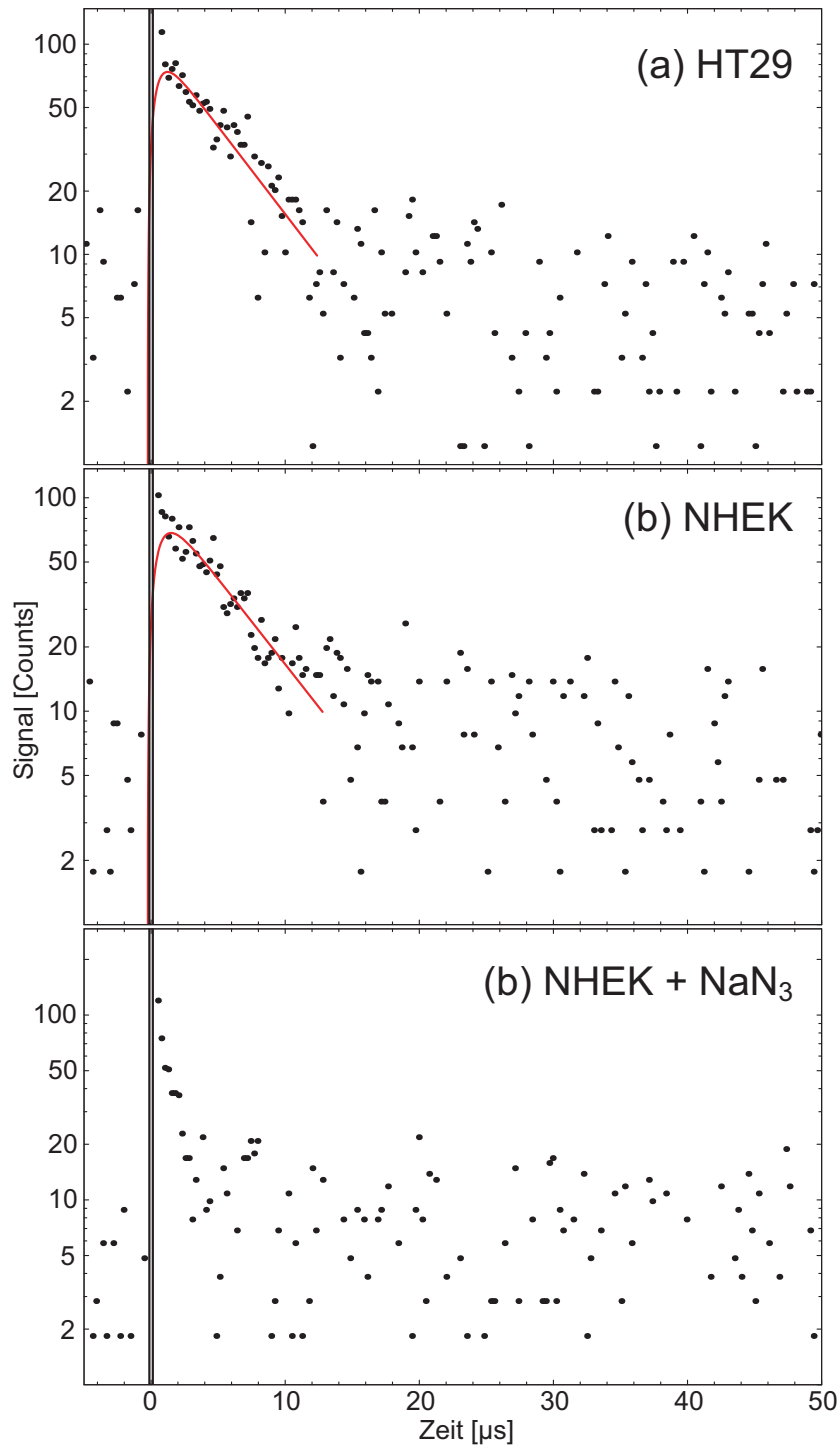


Abbildung 10.15: Singulett-Sauerstoff-Lumineszenzsignal generiert durch $1 \cdot 10^6 \text{ ml}^{-1}$ (a) HT29 Zellen (b) NHEK-Zellen und (c) NHEK-Zellen mit 50 mM Natriumazid, gelöst in H_2O .

$\tau_2 = (5 \pm 1) \mu\text{s}$ kürzer ist als bei den Zellmessungen aus Abschnitt 7.3. Dort wurde die Lebensdauer von Singulett-Sauerstoff in HT29-Zellen zu $11 - 6 \mu\text{s}$, je nach Photo-

sensibilisator bestimmt. Dies ist sicher mit dem Ort der Entstehung zu begründen. Photofrin lagert sich hauptsächlich in Membranen an. Dort ist aber aufgrund der langen Lebensdauer von Singulett-Sauerstoff in Lipid eine Lebensdauer von etwa 14 μs zu erwarten. Diese wird dann durch die Umgebung und eingelagerte Proteine verkürzt. In diesem Fall wird der Singulett-Sauerstoff vermutlich überall in der Zelle generiert. Somit auch in Bereichen mit deutlich kürzerer Lebensdauer für Singulett-Sauerstoff. Somit sollte auch die gesamte Lebensdauer im System kürzer sein.

Kapitel 11

Übersicht über die Ergebnisse und Erkenntnisse bei 355 nm Anregung

Mit Hilfe von UVA-Licht sollte die Erzeugung von Singulett-Sauerstoff durch endogene Substanzen nachgewiesen werden. Es wurden nur Stoffe verwendet und untersucht, die auch in lebenden Zellen vorkommen. Exogene Photosensibilisatoren wurden nicht eingesetzt. In Tabelle 11.1 sind die gewonnenen Ergebnisse dargestellt. Alle Messungen fanden bei Luftsättigung statt.

Für die Substanzen Riboflavin, FMN, FAD, Urocaninsäure und L- α -Phosphatidylcholin konnte die Erzeugung von Singulett-Sauerstoff durch UVA-Licht nachgewiesen werden. Die HT29- und NHEK-Zellsuspensionen erzeugten, durch UVA-Bestrahlung bei 355 nm, ebenfalls Singulett-Sauerstoff. In allen Fällen konnte die Lebensdauer von Singulett-Sauerstoff in diesen Systemen bestimmt werden. Für NAD, NADP und Cholesterin konnte keine Singulett-Sauerstoff-Erzeugung beobachtet werden. Im Fall L- α -Phosphatidylcholin konnte nachgewiesen werden, dass die Erzeugung von Singulett-Sauerstoff chemisch über die Typ-I-Reaktion erfolgt.

Durch den Vergleich der Singulett-Sauerstoff-Lumineszenzsignale bei Luftsättigung, welche von PNS und den Flavinen generiert wurden, konnte, ausgehend von der bekannten Singulett-Sauerstoff-Quantenausbeute Φ_{Δ} von PNS, die Singulett-Sauerstoff-Quantenausbeute der Flavine berechnet werden. Es zeigt sich, dass Riboflavin, als strukturell einfachstes Flavin, die höchste Singulett-Sauerstoff-Quantenausbeute $\Phi_{\Delta} = 0,54 \pm 0,07$ hat. Gefolgt von FMN ($\Phi_{\Delta} = 0,51 \pm 0,07$) und dem strukturell komplexen FAD ($\Phi_{\Delta} = 0,07 \pm 0,01$).

Für Riboflavin wurden in Abschnitt 10.2.2 die Raten und Ratenkonstanten ermittelt. Für das System Riboflavin in H₂O sind die Werte in Tabelle 11.2 dargestellt.

Photosensibilisator	Absorptionsquerschnitt bei 355 nm [10^{-17}cm^2]	Lebensdauer von Singulett-Sauerstoff [μs]	Singulett-Sauerstoff-Quantenausbeute	
			gemessen	Literatur
PN	4,1±0,3	14±2 (EtOH)	-	0,93±0,08 ^a 0,98±0,08 ^b
PNS	2,6±0,2	3,5±0,5 (H ₂ O)	-	0,97±0,06 ^a 0,98±0,08 ^b
Riboflavin	3,6±0,2	3,8±0,5 (H ₂ O)	indirekt: 0,54±0,07 direkt: 0,59±0,07 ^d 0,09±0,03 ^e	0,48 ^c
FMN	3,0±0,2	3,7±0,5 (H ₂ O)	indirekt: 0,51±0,07	-
FAD	2,7±0,2	3,5±0,5 (H ₂ O)	indirekt: 0,07±0,01	-
NAD	0,04±0,01	*	-	-
NADP	0,021±0,005	*	-	-
Urocaninsäure	0,17±0,04	13±4 (EtOH)	**	-
Cholesterin	0,045±0,011	*	-	-
L- α -PC	0,0015±0,0002	14±2 (EtOH)	**	-
HT29-Suspension	-	5±1 (H ₂ O)	-	-
NHEK-Suspension	-	5±1 (H ₂ O)	-	-

Tabelle 11.1: Zusammenfassung der Ergebnisse von Kapitel 10. Endogene Photosensibilisatoren unter Bestrahlung mit UVA-Licht. PN und PNS sind exogene Photosensibilisatoren und dienten als Vergleichsubstanz zur Bestimmung von Φ_{Δ} . ^a[MJC96], ^b[STD94], ^c[CMS88], ^d maximales Φ_{Δ} , ^e minimales Φ_{Δ} , *kein Signal detektiert, ** Φ_{Δ} konnte aufgrund des schwachen Lumineszenzsignals nicht bestimmt werden.

Vergleichbare Literaturwerte sind nicht bekannt. Ausgehend von diesen Untersuchungen konnte die Abhängigkeit der Singulett-Sauerstoff-Quantenausbeute Φ_{Δ} bezüglich der Sauerstoff-Konzentration bestimmt werden. Es zeigt sich, dass die

Rate / Ratenkonstante	experimenteller Wert
$k_{T_1} [\mu s^{-1}]$	$0,008 \pm 0,002$
$k_{T_1 O_2} + k_{T_1 \Delta} [\mu s^{-1} \mu M^{-1}]$	$0,0011 \pm 0,0003$
$k_{T_1 S_0} [\mu s^{-1} \mu M^{-1}]$	nicht messbar
$k_{\Delta} [\mu s^{-1}]$	$0,31 \pm 0,05$
$k_{\Delta S_0} [\mu s^{-1} \mu M^{-1}]$	nicht messbar

Tabelle 11.2: Die ermittelten Raten- und Ratenkonstanten von Riboflavin in H_2O .

Singulett-Sauerstoff-Quantenausbeute mit der Sauerstoff-Konzentration ansteigt. Bei Luftsättigung beträgt Φ_{Δ} maximal $0,59 \pm 0,07$ bzw. mindestens $0,09 \pm 0,03$.

Kapitel 12

Zusammenfassung

Unter den reaktiven Sauerstoffspezies, die durch lichtaktivierte Photosensibilisatoren im Rahmen von Photochemotherapien erzeugt werden, spielt der Singulett-Sauerstoff eine zentrale Rolle bei der photodynamischen Therapie. Die Aufklärung der photophysikalischen Vorgänge im Rahmen der Wechselwirkung zwischen Photosensibilisator, Sauerstoff und Umgebung ist von grundlegender Bedeutung für das Verständnis der Singulett-Sauerstoff-Generierung und deren Auswirkungen bei Photochemotherapien. Dazu wurde die zeitaufgelöste Detektion der Singulett-Sauerstoff-Lumineszenz bei 1269 nm verwendet. Zum Einsatz kam ein hochempfindlicher Infrarot-Photomultiplier mit gutem Signal-Rausch-Verhältnis. In Verbindung mit einer schnellen Zähleinrichtung wurde zusätzlich eine Zeitauflösung von etwa 100 ns erreicht, so dass das verwendete Detektionssystem bezüglich der zeitaufgelösten Messung der Singulett-Sauerstoff-Lumineszenz eine entscheidende Verbesserung darstellt. Dadurch konnte das Verhalten von Photosensibilisator und Singulett-Sauerstoff in komplexer werdender Umgebung betrachtet werden.

Im einfachsten System wurde Singulett-Sauerstoff in Lösung untersucht. In Wasser (H_2O) konnte eine Lebensdauer von $(3,5 \pm 0,5) \mu\text{s}$ für Singulett-Sauerstoff ermittelt werden. Für Tetraazaporphyrin in deuteriertem Ethanol (EtOD) zeigt sich, dass das zeitliche Verhalten der Singulett-Sauerstoff-Lumineszenz durch ein Modell eines Differentialgleichungssystems für die Besetzung des Triplett-Zustands des Farbstoffs und des Singulett-Zustands des Sauerstoffs beschrieben werden kann. Durch die Variation der Parameter Photosensibilisator-, Sauerstoff- und Quencher-Konzentration konnten sämtliche relevanten Raten und Ratenkonstanten für die Erzeugung und den Zerfall von Singulett-Sauerstoff bestimmt werden.

Um das Verhalten von Singulett-Sauerstoff in Zell-Suspensionen zu verstehen, wur-

den als Zwischenschritt Lipid-Suspensionen untersucht. Die Lebensdauer von Singulett-Sauerstoff in reinem Phosphatidylcholin konnte zu $(15 \pm 3) \mu\text{s}$ bestimmt werden. In der Suspension aus H_2O und Lipid spielt die Diffusion des Sauerstoffs durch Lipid- und Wasserbereiche eine entscheidende Rolle. Dadurch ergibt sich z.B. die Gesamt-Lebensdauer von Singulett-Sauerstoff als Zwischenzeit von $(7,3 \pm 1,1) \mu\text{s}$ (15 mg/ml Lipid in H_2O) die durch die Lebensdauer von Singulett-Sauerstoff in Wasser von $(3,5 \pm 0,5) \mu\text{s}$ und in Lipid von $(15 \pm 3) \mu\text{s}$ bestimmt ist.

Für die Zell-Suspensionen wurden sowohl eukaryotische Zellen (HT29) als auch prokaryotische Zellen (*Staphylococcus aureus*) verwendet. Im Fall der HT29-Zellen in H_2O zeigte sich, dass die Lebensdauer von Singulett-Sauerstoff vom Ort der Erzeugung abhängt. Je nach verwendetem Photosensibilisator und Inkubationszeit konnte der Ort variiert werden. In der Zellmembran lebt der Singulett-Sauerstoff $(10 \pm 3) \mu\text{s}$, in den Membranen der Mitochondrien $(11 \pm 3) \mu\text{s}$ und in der Membran der Lysosome $(6 \pm 2) \mu\text{s}$. Durch die Diffusion von Singulett-Sauerstoff sind die Lebensdauern wieder als Zwischenzeiten, analog zu den Lipidsuspensionen, zu betrachten. Aufgrund der hier gemessenen langen Lebensdauern von Singulett-Sauerstoff, gegenüber der kurzen Lebensdauer von $(3,5 \pm 0,5) \mu\text{s}$ im Wasser, muss das Lumineszenzsignal aus der Zelle und nicht aus dem Wasser stammen. Somit konnte Singulett-Sauerstoff direkt in lebenden Zellen nachgewiesen werden.

Im Fall Bakterien in H_2O hat sich gezeigt, dass die Lebensdauer von Singulett-Sauerstoff von der Bakterien-Konzentration abhängt. Die Lebensdauer von Singulett-Sauerstoff lässt sich hier als Zwischenzeit betrachten, die durch die Lebensdauer von Singulett-Sauerstoff im Wasser und im Bakterium bestimmt ist. Bei einzelnen Bakterien im Wasser lebt der Singulett-Sauerstoff $(6 \pm 2) \mu\text{s}$. Bei hohen Bakterien-Konzentrationen klumpen diese traubenförmig zusammen, so dass das Lösungsmittel H_2O eine untergeordnete Rolle spielt und die Bakterienzeit dominiert. Aus diesem Zusammenhang konnte die Lebensdauer von Singulett-Sauerstoff in reinen *S. aureus*-Bakterien zu $(40 \pm 16) \mu\text{s}$ bestimmt, sowie der Entstehungsort von Singulett-Sauerstoff im Randbereich der Bakterien ermittelt werden.

Mit Hilfe von UVA-Licht bei 355 nm konnte die Erzeugung von Singulett-Sauerstoff durch endogene Substanzen nachgewiesen werden. Für die Substanzen Riboflavin, Flavin-Mononukleotid (FMN), Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD), Urocaninsäure und L- α -Phosphatidylcholin in Lösung konnte die Erzeugung von Singulett-Sauerstoff durch UVA-Licht nachgewiesen werden. Im Fall L- α -Phosphatidylcholin erfolgt die Erzeugung von Singulett-Sauerstoff chemisch über die Typ-I-Reaktion. Für die Flavine wurde die Singulett-Sauerstoff-Quantenausbeute Φ_Δ bestimmt. Es zeigt sich, dass Riboflavin als strukturell einfachstes Flavin die höchste Singulett-

Sauerstoff-Quantenausbeute $\Phi_{\Delta} = 0,54 \pm 0,07$ hat, gefolgt von FMN ($\Phi_{\Delta} = 0,51 \pm 0,07$) und dem strukturell komplexen FAD ($\Phi_{\Delta} = 0,07 \pm 0,01$). Aufgrund dieser hohen Singulett-Sauerstoff-Quantenausbeuten ist es möglich, dass die Flavine auch in der Haut Singulett-Sauerstoff ausreichend erzeugen um dort Schäden hervorzurufen. Für Riboflavin in H_2O konnten, durch die Variation der Parameter Photosensibilisator- und Sauerstoff-Konzentration, sämtliche relevanten Raten und Ratenkonstanten bestimmt werden.

Ausgehend vom einfachen System der endogenen Photosensibilisatoren in Lösung konnte auch gezeigt werden, dass Zellsuspensionen unter Bestrahlung mit UVA-Licht Singulett-Sauerstoff generieren.

Mit der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass das beschriebene, neuartige Detektionssystem eine wesentliche Verbesserung für den direkten, lumineszenzspektroskopischen Nachweis des Singulett-Sauerstoffs darstellt. Es konnte insbesondere Singulett-Sauerstoff erstmals direkt in lebenden Zellen nachgewiesen und die Lebensdauer von Singulett-Sauerstoff in dieser Umgebung bestimmt und interpretiert werden.

Anhang A

Messprinzip zur Bestimmung des Sauerstoffgehalts

A.1 Faseroptische Messung der Sauerstoff-Konzentration

Hier basiert das Messprinzip auf dem Effekt der Lumineszenzlöschung bestimmter Luminophore (Indikatoren) durch molekularen Sauerstoff und der damit verbundenen Änderung des Lumineszenzsignals. Der faseroptische Aufbau besteht im Wesentlichen aus einer LED zur Anregung des optischen Sensors, einem Glasfaserkabel zur Lichtleitung und einem Photomultiplier zur Detektion der Lumineszenz des optischen Sensors. Der Sensor dient als Indikator und ist am Ende der Glasfaser in eine Matrix eingebettet. Das im Rahmen dieser Arbeit verwendete Gerät Microx TX VP 1.0 (PreSens GmbH, Regensburg) misst die Lumineszenzabklingzeit der immobilisierten Luminophore als sauerstoffabhängigen Parameter unter Verwendung der Phasen-Modulationsmethode. Hierbei wird die Fluoreszenz des Indikators mit sinusförmig moduliertem Licht angeregt, wobei die Lumineszenzabklingzeit des Indikators eine zeitliche Verzögerung des Emissionslichts verursacht, da die angeregten Moleküle nicht sofort emittieren, sondern eine gewisse Zeit im angeregten Zustand bleiben (Fluoreszenzlebensdauer). Aus dieser zeitlichen Verschiebung um einen Phasenwinkel lässt sich die mittlere Abklingzeit und daraus der Sauerstoffgehalt bestimmen [P01b].

Vor jeder Messung muss der Sensor einer 2-Punkt-Kalibrierung unterzogen werden. Dazu werden zwei Kalibrierwerte, nämlich sauerstofffreies Wasser (Kalibrierstan-

dard 0 %) und eine luftgesättigte Lösung (Kalibrierstandard 100 %) verwendet. Dem Wasser wird laut Hersteller durch eine chemische Reaktion mit Natriumdithionit sehr effektiv Sauerstoff entzogen. Als Kalibrierstandard 100 % muss das Lösungsmittel verwendet werden, in welchem die Messung ablaufen soll. Um im Falle von EtOH als Lösungsmittel die 100 %-Luftsättigung zu erhalten, wird durch dieses für 10 min ethanolhaltige Luft gepumpt. Zur Kontrolle der Kalibrierung wird anschließend der Sauerstoffgehalt in den beiden Kalibrierlösungen gemessen, wobei sich jedesmal Abweichungen von bis zu 0,2 %-LS ergeben. Laut Hersteller liegt die maximale Auflösung in dem in dieser Arbeit nötigen Messbereich bei 0,07 %-LS. Addiert man noch die Schwankung während der Messung von 0,1 %-LS hinzu, erhält man eine Messungenauigkeit von etwa $\pm 0,4$ %-LS. Die Umrechnung des Sauerstoffgehalts (%-LS) in die jeweilige Sauerstoff-Konzentration (μM) erfolgte unter Benutzung der bekannten Sauerstoff-Konzentration (μM) bei 100 % Luftsättigung.

A.2 Löslichkeit von Sauerstoff in Flüssigkeiten

Für die Löslichkeit von Sauerstoff in einem Lösungsmittel gilt in guter Näherung das Henry-Dalton-Gesetz, welches besagt, dass die Konzentration x [M] des gelösten Gases proportional dem Partialdruck p des Gases über dem Lösungsmittel ist [HWW85]:

$$x_{\text{O}_2,(\text{Lösung})} = K \times p_{\text{O}_2,(\text{Gas})}. \quad (\text{A.1})$$

Eine alternative Formulierung ist, die Gültigkeit des idealen Gasgesetzes vorausgesetzt, dass das von einem vorgegebenen Flüssigkeitsvolumen gelöste Gasvolumen bei gegebener Temperatur T unabhängig vom Druck ist [HWW85]:

$$\alpha = \frac{V_{\text{O}_2, \text{gelöst}}}{V_{\text{Lösungsmittel}}}. \quad (\text{A.2})$$

Die Proportionalitätsfaktoren α und K sind temperaturabhängig, und müssen Tabellenwerken entnommen werden.

Folgende Tabelle A.1 für α in H_2O stammt aus [D78]: Die Löslichkeit von Sauerstoff in Wasser nimmt also mit steigender Temperatur ab. Für die Konzentration des gelösten Sauerstoffs in Wasser, abhängig von der Temperatur und dem Druck, ergibt sich dann die Formel

$$x_{\text{O}_2,(\text{Lösung})} = \frac{\alpha(T)}{RT} \times p_{\text{O}_2,(\text{Gas})}, \quad (\text{A.3})$$

T in [°C]	α	T in [°C]	α	T in [°C]	α	T in [°C]	α
0	0,04889	10	0,03802	20	0,03102	30	0,02608
1	0,04758	11	0,03718	21	0,03044	35	0,02440
2	0,04633	12	0,03637	22	0,02988	40	0,02306
3	0,04512	13	0,03559	23	0,02934	45	0,02187
4	0,04397	14	0,03486	24	0,02881	50	0,02090
5	0,04287	15	0,03415	25	0,02831	60	0,01946
6	0,04180	16	0,03348	26	0,02783	70	0,01833
7	0,04080	17	0,03283	27	0,02736	80	0,01761
8	0,03983	18	0,03220	28	0,02691	90	0,0172
9	0,03891	19	0,03161	29	0,02649	100	0,0170

Tabelle A.1: Abhängigkeit der Löslichkeitskonstanten α von der Temperatur T in H_2O .

mit der allgemeinen Gaskonstanten $R = 8,314472 \frac{J}{mol \cdot K}$ ($= \frac{kPa \cdot l}{mol \cdot K}$). Für den Standarddruck $p_{ref} = 1013,25$ hPa und einen Volumenanteil von Sauerstoff von 20,95 % in der Umgebungsluft ergibt sich ein Sauerstoffpartialdruck von $p_{O_2, (Gas)} = 212,3$ hPa. Mit diesen Werten errechnet sich die Konzentration von Sauerstoff in H_2O bei Raumtemperatur (20 °C) zu $x_{O_2, (H_2O)} = 270,1 \mu M$.

Für deuteriertes Wasser D_2O fehlt in der Literatur die Angabe der entsprechenden Zahlenwerte, allerdings ist das Verhältnis der Löslichkeit von Kohlendioxid CO_2 in D_2O zu der in H_2O bekannt, was als Grundlage für die Abschätzung der Löslichkeit von Sauerstoff in D_2O herangezogen wurde. Dieses Verhältnis ist 0,88, wodurch sich bei Luftsättigung ca. 238 μM Sauerstoff lösen [LB62].

Für Ethanol (EtOH) ist in der Literatur ein Wert von 1850 μM bekannt [LB62]. Für deuteriertes Ethanol EtOD wird derselbe Wert angenommen.

Für die Sauerstoffkonzentration von in Wasser suspendiertem Phosphatidylcholin wird in der Literatur ein Konzentrationsverhältnis $\frac{x_{O_2, (Lipid)}}{x_{O_2, (Wasser)}} = 3,9$ angegeben [MBB05]. Dieses wird auch für getrocknetes Phosphatidylcholin verwendet.

Anhang B

Probleme bei der Lumineszenzdetektion

Bisher wurde angenommen, dass bei $\lambda = 1269$ nm nur die Lumineszenz des Singulett-Sauerstoffs leuchtet. Leider kann es in diesem Bereich auch Ausläufer der Phosphoreszenz des Photosensibilisators geben, welche dann die Lumineszenz des Sauerstoffs überlagert. Um ein Gefühl für die Phosphoreszenz bei $\lambda = 1269$ nm zu bekommen, ist es notwendig die Phosphoreszenz neben der Sauerstofflinie zu betrachten. In Abbildung B.1 ist die Phosphoreszenz von 50 $\mu\text{g/ml}$ Photofrin in H_2O bei 95 % Luftsättigung dargestellt. Die Laserleistung im Experiment betrug 100 mW und es wurden $8 \cdot 10^4$ Durchgänge addiert. Bei $\lambda = 1212$ nm (a) ist ein exponentiell abfallendes Signal zu sehen. Im Maximum werden etwa 400 Counts erreicht. Die Abklingdauer wurde hier, der Vollständigkeit halber, zu $\tau_{1212} = (2,5 \pm 0,5) \mu\text{s}$ ermittelt, diese hat jedoch keinerlei Bedeutung für uns. Bei $\lambda = 1342$ nm (b) ist ebenfalls ein exponentiell abfallendes Signal zu sehen, welches im Maximum aber nur 50 Counts und eine Abklingdauer von $\tau_{1342} = (4,5 \pm 0,9) \mu\text{s}$ besitzt. Es ist nun anzunehmen, dass zwischen den beiden Wellenlängen ebenfalls Phosphoreszenz vorhanden ist. Diese sinkt in der Intensität offensichtlich von den kurzen Wellenlängen her zu den langen. Weitere Messungen bei anderen Wellenlängen bestätigen dies ($\lambda = 1172$ nm : 800 Counts, $\lambda = 1232$ nm : 300 Counts und $\lambda = 1312$ nm : 120 Counts). Unter Berücksichtigung der Phosphoreszenz bei den unterschiedlichen Wellenlängen lässt sich nun die Phosphoreszenz bei $\lambda = 1269$ nm durch lineare Interpolation abschätzen. Dabei wurden die einzelnen Phosphoreszenzsignale Kanal für Kanal summiert und, entsprechend ihrer Wellenlänge, gewichtet um das Phosphoreszenzsignal bei 1269 nm abzuschätzen. Betrachten wir nun das Lumineszenzsignal von Singulett-Sauerstoff bei $\lambda = 1269$ nm

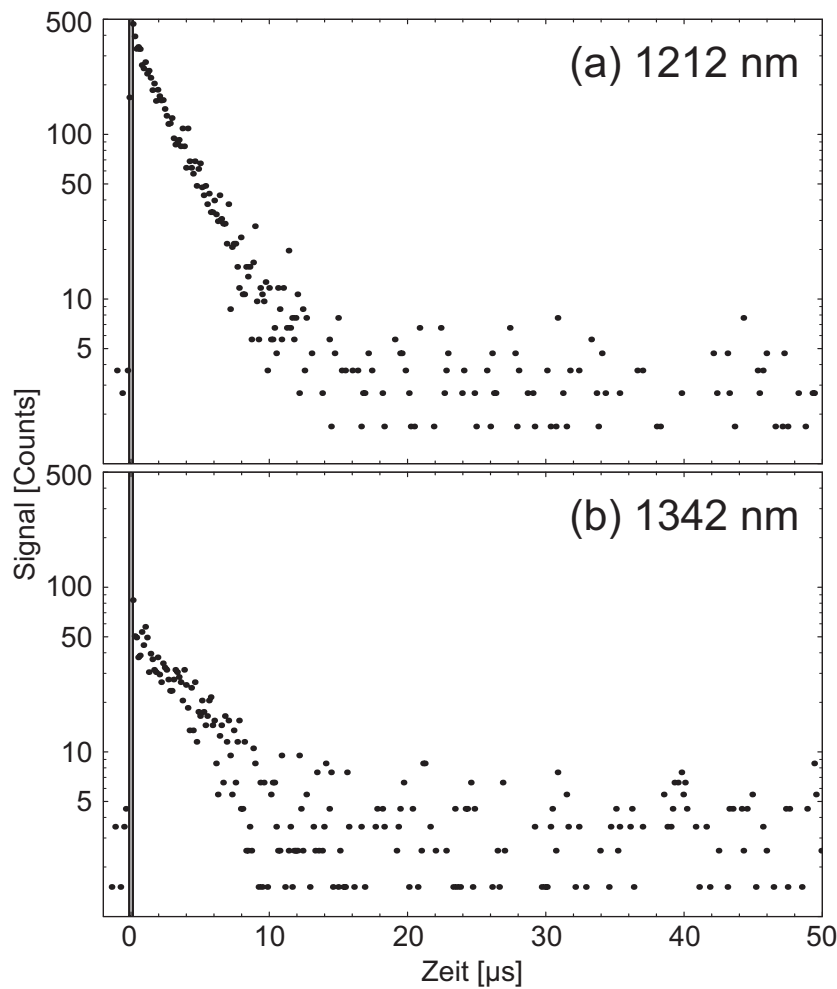


Abbildung B.1: Ausläufer der Phosphoreszenz von 50 $\mu\text{g/ml}$ Photofrin in H_2O bei (a) 1212 nm und (b) 1342 nm.

inklusive der Phosphoreszenz, also das im Labor gemessene Originalsignal (Abbildung B.2 (a)). Das Signal hat im Maximum 1500 Counts. Der berechnete Untergrund hat eine Signalthöhe von 90 Counts und sollte deshalb wenig Einfluss auf das Ergebnis haben. Trotzdem entsteht der Eindruck, dass das Signal in der Gegend von 0 μs zu hoch, etwa bei 300 Counts, beginnt. Auch der durch den PC berechnete Fit beginnt bei $t_0 = -0,2 \mu\text{s}$, was natürlich nicht realistisch ist, da der Laserpuls bei 0 μs liegt. Das Lumineszenzsignal kann nicht vor der Anregung beginnen. Die Anstiegszeit beträgt $\tau_1 = (2,6 \pm 0,7) \mu\text{s}$ und die Abklingdauer $\tau_2 = (3,3 \pm 0,5) \mu\text{s}$. In Abbildung B.2 (b) ist nun das Signal bei $\lambda = 1269 \text{ nm}$ zu sehen, welches um das abgeschätzte Phosphoreszenzsignal bei $\lambda = 1269 \text{ nm}$ reduziert ist. Das Signal beginnt jetzt bei $t_0 = 0,1 \mu\text{s}$ und somit erst nach der Anregung. Der Eindruck des zu frühen Signalbeginns ist verschwunden. Die Anstiegszeit beträgt $\tau_1 = (2,4 \pm 0,7) \mu\text{s}$, die Abklingdauer $\tau_2 = (3,5 \pm 0,5) \mu\text{s}$. Der Unterschied zu vorher bewegt sich also innerhalb der Fehler.

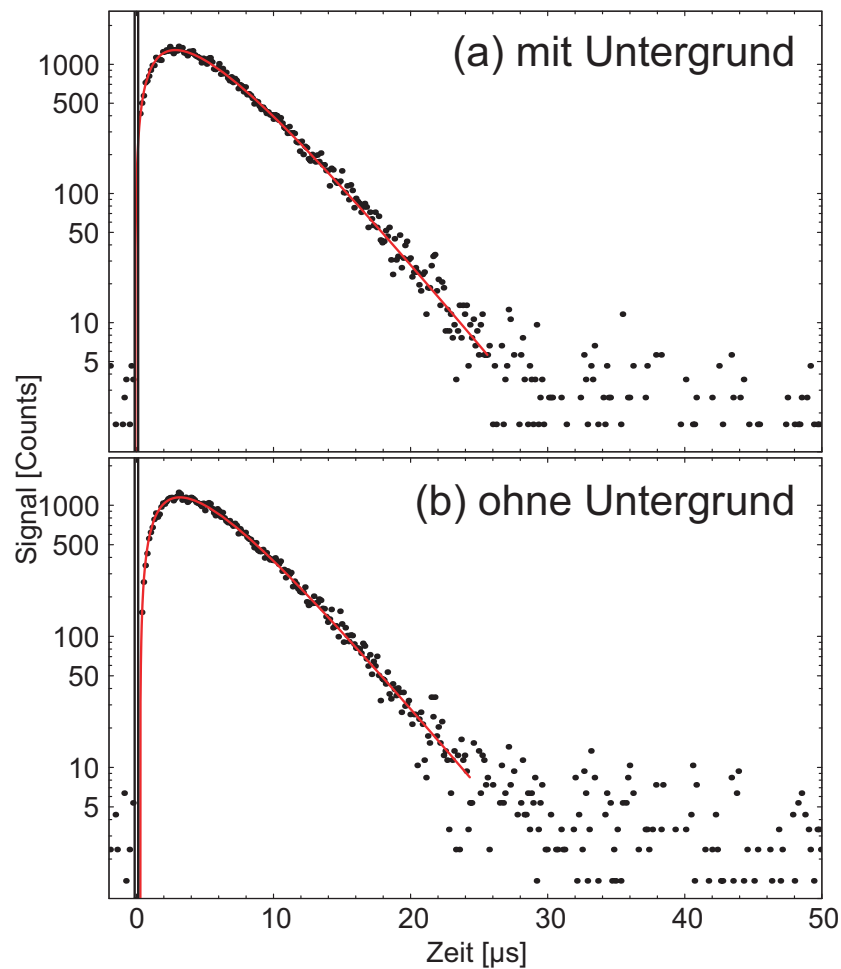


Abbildung B.2: Lumineszenz von Singulett-Sauerstoff, generiert von 50 $\mu\text{g/ml}$ Photofrin in H_2O bei $\lambda = 1269 \text{ nm}$ (a) mit Phosphoreszenz als Untergrund und (b) ohne Phosphoreszenz (berechnet).

Diese Überlegungen zeigen, dass die Phosphoreszenz das gemessene Signal bei $\lambda = 1269 \text{ nm}$ beeinflussen kann. Die Erfahrung hat aber gezeigt, dass der Fehler bei hoher Sauerstoffkonzentration sehr gering ist. Bei geringer Sauerstoffkonzentration nimmt die Intensität der Lumineszenz des Singulett-Sauerstoffs ab, während die Phosphoreszenz des Photosensibilisators, aufgrund des Fehlens vom Quencher Sauerstoff, steigt. Somit wird der Fehler bei geringer Sauerstoffkonzentration immer größer. Insbesondere bei Photofrin in H_2O hat sich gezeigt, dass der Anstieg der Lumineszenz bei weniger als 1 % Luftsättigung sogar verschwinden kann.

Anhang C

Freeze-Pump-Thaw-Cycle

Durch den Freeze-Pump-Thaw-Cycle (Einfrieren-Abpumpen-Auftauen-Zyklus) ist es möglich, Gase effektiv aus Flüssigkeiten zu entfernen. In dieser Arbeit wurde der Prozess verwendet, um Sauerstoff aus Flüssigkeiten zu entfernen. In Abbildung C.1 ist der schematische Aufbau zur Durchführung des Freeze-Pump-Thaw-Cycle dargestellt. Die zu untersuchende und zu entgasende Substanz wird in eine Küvette

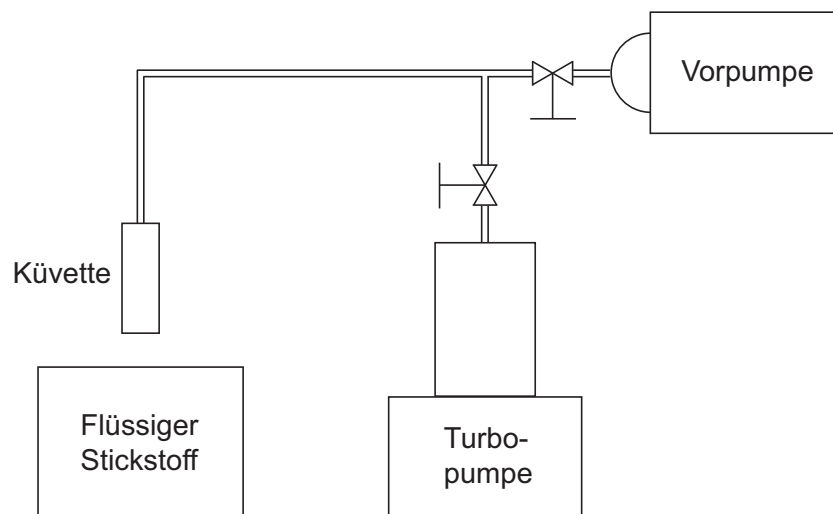


Abbildung C.1: Schematischer Aufbau zur Durchführung des sog. Freeze-Pump-Thaw-Cycle.

eingbracht. Die Küvette sollte nicht zu mehr als 50 % gefüllt sein, um Schäden beim Einfrieren zu vermeiden. Die gefüllte Küvette wird über Ventile luftdicht jeweils mit einer Vor- und einer Turbopumpe verbunden. Vor dem Start sind alle Ventile geschlossen und beide Pumpen sind in Betrieb. Durchgeführt werden nun folgende Schritte:

1. Die Küvette wird zum Einfrieren in das Stickstoffbad eingeführt. Beim erstmaligen Einfrieren empfiehlt es sich die Küvette langsam, am besten nur im kalten Stickstoffdampf über dem Stickstoffbad, einzufrieren. Dies vermeidet Spannungen in der Küvette und somit einen Springen der Küvette.
2. Wenn der Inhalt der Küvette gefroren ist, öffnet man das Ventil zur Vorpumpe und pumpt das Gas über der gefrorenen Flüssigkeit ab. Die Küvette bleibt dabei weiterhin im Stickstoffbad. Nach einigen Minuten schließt man das Ventil zur Vorpumpe und öffnet das Ventil zur Turbopumpe zum weiteren Abpumpen. Der gesamte Pumpvorgang sollte etwa 20 - 30 Minuten dauern. Für die ersten paar Durchgänge genügt es, mit der Vorpumpe abzupumpen.
3. Alle Ventile werden geschlossen und anschließend die Küvette aus dem Stickstoffbad entfernt. Nun kann das Auftauen der Flüssigkeit beginnen. Bei Ethanol empfiehlt es sich, mit Hilfe von Druckluft und bei Wasser mit Hilfe eines Wasserbades aufzutauen. Während des Auftauens kann man Bläschen aus der Flüssigkeit aufsteigen sehen. Es kommt zum Ausgleich des Luftdrucks in der Flüssigkeit und des Luftdrucks oberhalb der Flüssigkeit. Die Anzahl und Stärke der Bläschen nimmt bei jedem Durchgang ab.
4. Nach dem Auftauen erfolgt das erneute Einfrieren und der Zyklus startet wieder mit Punkt 1. Nach dem Auftauen sollte mit dem Einfrieren etwa 1 Minute später begonnen werden. Einerseits bekommt das System genügend Zeit zum Ausgleichen der Drücke und andererseits wird die Küvette nicht zu stark erwärmt (Spannungen vermeiden).

Die Praxis hat gezeigt, dass man nach etwa 20 Zyklen (davon typischerweise etwa vier nur mit Vorpumpe und etwa 16 mit Vor- und Turbopumpe) genug Sauerstoff aus dem System entfernt hat, um mit unserer Detektionsempfindlichkeit kein Singulett-Sauerstoff-Signal mehr zu detektieren. Nach diesen Zyklen wird die Küvette fest verschlossen und zur Untersuchung in den Aufbau von Abschnitt 4.1 eingebracht. Allgemeine Hinweise: Während der Prozedur sollten Erschütterungen der Küvette vermieden werden. Denn durch die Temperaturunterschiede und den damit verbundenen Spannungen in der Küvette kann es leicht zu Schäden an der Küvette kommen.

Durch kurzes vorsichtiges Abpumpen des Gases über der Flüssigkeit vor Beginn des Zyklus mit der Vorpumpe wird bereits ein Großteil der Luft entfernt (Kochen der Flüssigkeit vermeiden!). Dadurch lässt sich die Gesamtprozedur verkürzen bzw. das Ergebnis bei gleicher Zyklenanzahl verbessern.

Literaturverzeichnis

- [A01] B. M. Aveline, Primary Processes in photosensitization mechanisms, in: P. Calzavara-Pinton, R.-M. Szeimies, B. Ortel, Photodynamic Therapy and Fluorescence Diagnosis in Dermatology, Kap. 2, Elsevier Amsterdam (2001)
- [ALF85] E. M. Alderman, R. R. Lobb, J. W. Fett, J. F. Riordan, J. L. Bethune, B. L. Vallee, Angiogenic activity of human tumor plasma membrane components, Biochem. 24 (1985) 7866
- [ASS97] C. Abels, R.-M. Szeimies, P. Steinbach, C. Richert, A. E. Goetz, Targeting of the tumor microcirculation by photodynamic therapy with a synthetic porphyrine, J. Photochem. Photobiol. B: Biol. 40 (1997) 305
- [B76] D. Belluš, Quenchers of singlet oxygen - a critical review, in: Rånby, Rabek, Singlet oxygen, reactions with organic compounds and polymers, S. 61, Wiley & Sons, Chichester (1978).
- [BCG95] M. Bossa, E. Cervone, C. Garzillo, G. del Re, On the electronic state of the extended porphyrin familiy, J. Mol. Struct. Theochem. 342 (1995) 73
- [BES87] H. Baumgärtl, A. M. Ehrly, K. Saeger-Lorenz, D. W. Lübbers, Initial results of intracutaneous measurements of PO₂ profiles. In: A. M. Ehrly, J. Hauss, R. Huch, Clinical oxygen pressure measurement, Springer-Verlag Berlin, 1987
- [BK92] A. Baker, J. R. Kanofsky, Quenching of singlet oxygen by biomolecules from L1210 leukemia cells, Photochem. Photobiol. 55 (1992) 523
- [BK93] A. Baker, J. R. Kanofsky, Time-resolved studies of singlet-oxygen emission from L1210 leukemia cells labeled with 5-(N-hexadecanoyl) amino eosin. A comparison with one-dimensional model of singlet-oxygen diffusion and quenching, Photochem. Photobiol. 57 (1993) 720

- [BKC98] , P. Bilski, B. M. Kukielczak, C. F. Chignell, Photoproduction and direct spectral detection of singlet molecular oxygen ($^1\text{O}_2$) in keratinocytes stained with rose bengal, *Photochem. Photobiol.* 69 (1998) 675
- [BLT94] R. V. Bensasson, E. J. Land, T. G. Truscott, *Excited States and Free Radicals in Biology and Medicine*, Oxford University Press, Kap. 2, Oxford New York Tokio (1993)
- [BME02] D. Baumer, M. Maier, R. Engl, R.-M. Szeimies, W. Bäuml, Singlet oxygen generation by 9-acetoxy-2,7,12,17-tetrakis-(b-methoxyethyl)-porphycene (ATMPn) in solution, *Chem. Phys.* 285 (2002) 309
- [BME05] J. Baier, M. Maier, R. Engl, M. Landthaler and W. Bäuml, Time-Resolved Investigations of Singlet Oxygen Luminescence in Water, in Phosphatidylcholine, and Aqueous Suspension of Phosphatidylcholine or HT29 Cells, *J. Phys. Chem. B* 109 (2005) 3041
- [BMM97] S. E. Braslavsky, M. Müller, D. O. Mártire, S. Pörting, S. G. Bertolotti, S. Chakravorti, G. Koç-Weier, B. Knipp, K. Schaffner, Photophysical properties of porphycene derivatives (18π porphyrinoids), *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 40 (1997) 191
- [BMM05] J. Baier, T. Maisch, M. Maier, E. Engel, W. Bäuml, UVA light and singlet oxygen quantum yield of endogenous photosensitizers at different oxygen concentrations, übermittelt zu *J. Am. Chem. Soc.* (2005)
- [BPB04] S. P. Baba, D. K. Patel, B. Bano, Modification of sheep plasma kininogen by free radicals, *Free Radic. Res.* 38 (2004) 393
- [CMS88] J. N. Chacon, J. McLearn, R. S. Sinclair, Singlet oxygen yields and radical contributions in the dye-sensitized photooxidation in methanol of esters of polyunsaturated fatty acids (oleic, linoleic, linolenic and arachidonic), *Photochem. Photobiol.* 47 (1988) 647
- [D73] T. J. Dougherty, Photoradiation therapy, in: *Abstracts of the American Chemical Society Meeting*, Chicago (1973)
- [D78] J. A. Dean, *P. Lange's Handbook of Chemistry*, 12. Auflage (1978)
- [DGH98] T. J. Dougherty, C. J. Gomer, B. W. Henderson, G. Jori, Photodynamic Therapy, *J. Natl. Cancer Inst.* 90 (1998) 889

- [DH91] M. D. Daniell, J. S. Hill, A History of Photodynamic Therapy, Aust. N. Z. J. Surgery 61 (1991) 340
- [E03] R. Engl, Die Erzeugung und Relaxation von Singulett-Sauerstoff in homogenen Lösungen sowie Lipid- und Zellsuspensionen, Dissertation, Universität Regensburg (2003)
- [EAF98] B. Ehrenberg, J. L. Anderson, C. S. Foote, Kinetics and yield of singlet oxygen photosensitized by hypericin in organic and biological media, Photochem. Photobiol. 68 (1998) 135
- [EKM02] R. Engl, R. Kilger, M. Maier, K. Scherer, C. Abels, W. Bäumler, Singlet Oxygen Generation by 8-Methoxypsoralen in Deuterium Oxide: Relaxation Rate Constants and Dependence of the Generation Efficacy on the Oxygen Partial Pressure, J. Phys. Chem. B 106 (2002) 5776
- [ET76] D. F. Evans, J. N. Tucker, Reactivity of the ($^1\Delta_g$)₂ and ($^1\Delta_g$) states of oxygen produced by direct laser excitation, J. Chem. Soc. Farad. Trans. 272 (1976) 1661
- [F97] S. Fickweiler, In-Vitro-Untersuchungen zur Wirkung neuer Sensibilisatoren für die Photodynamische Therapie von Hauterkrankungen, Dissertation, Universität Regensburg (1997)
- [F05] T. Fuß, Untersuchung der Lumineszenz von Singulett-Sauerstoff in wässrigen Lösungen und Suspensionen, Diplomarbeit, Universität Regensburg (2005)
- [F91] C. S. Foote, Definition of Type I and Type II photosensitized Oxidation, Photochem. Photobiol. 54 (1991) 659
- [FK95] Y. Fu, J. R. Kanofsky, Singlet-oxygen generation from liposomes: A comparison of time-resolved 1270 nm emission with singlet-oxygen kinetics calculated from a one-dimensional model of singlet-oxygen diffusion and quenching, Photochem. Photobiol. 62 (1995) 692
- [G85] A. W. Girotti, Mechanisms of lipid peroxidation, J. Free Rad. Biol. Med. 1 (1985) 87
- [G89] A. W. Girotti, Photodynamic lipid peroxidation in biological systems, Photochem. Photobiol. 51 (1989) 497
- [GE89] E. Gross, B. Ehrenberg, The Partition and Distribution of Porphyrins in Liposomal Membranes. A Spectroscopy Study, Biochem. Biophys Acta 118 (1989) 983

- [GR92] A. A. Gorman, M. A. J. Rodgers, Current perspectives of singlet oxygen detection in biological environments, *J. Photochem. Photobiol. B* 14 (1992) 159
- [H50] G. Herzberg, *Molecular Spectra and molecular structure, I. Spectra of diatomic molecules*, 2nd ed., Van Nostrand New York, Kap. III, V u. VIII (1950)
- [H67] M. Hercher, An Analysis of Saturable Absorbers, *Appl. Opt.* 6 (1967) 947
- [H01] S. Habeker, *Darstellung der Lokalisation von Fluoreszenzfarbstoffen in vitro*, Diplomarbeit, Universität Regensburg (2001)
- [HJM02] A. Hergueta-Bravo, M. E. Jimenez-Hernandez, F. Montero, E. Oliveros, G. J. Orellana, Singlet Oxygen-Mediated DNA Photocleavage with Ru(II) Polypyridyl Complexes, *Phys. Chem. B* 106 (2002) 4010
- [HLM82] W. Hoppe, W. Lohmann, H. Markl, H. Ziegler, *Biophysik - Ein Lehrbuch*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2. Auflage (1982)
- [HS98] K. M. Hanson, J. D. Simon, Epidermal trans-urocanic acid and the UV-A-induced photoaging of the skin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95 (1998) 10576
- [HW98] H. Haken, H. C. Wolf, *Molekülphysik und Quantenchemie*, 3. Aufl., Kap. 13, Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York (1998)
- [HWW85] A. F. Holleman, E. Wiberg, N. Wiberg, *Lehrbuch der anorganischen Chemie*, de Gruyter Berlin, 99.-100. Auflage (1985)
- [IMM95] V. Iani, J. Moan, L. W. Ma, Measurements of light penetration into human tissues in vivo, *SPIE Proc.* 2625 (1995) 339
- [IPH03] S. Islam, A. Penzkofer, P. Hegemann, Quantum yield of triplet formation of Riboflavin in aqueous solution and of flavin mononucleotide bound to the LOV1 domain, *Chemical Physics* 291 (2003) 97
- [JG94] L. R. Jones, L. I. Grossweiner, Singlet oxygen generation by Photofrin in homogeneous and light-scattering media, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 26 (1994) 249
- [K77] N. I. Krinsky, Singlet oxygen in biological systems, *Trends in biochemical sciences* 2 (1977) 35
- [K84] D. Kessel, Hematoporphyrin and HpD: photophysics, photochemistry and phototherapy, *Photochem. Photobiol.* 36 (1984) 851

- [K85] M. Kasha, Singlet oxygen electronic structure and energy transfer, in: A. A. Frimer, Singlet O₂, Vol. I to Vol. IV, CRC Press Boca Raton Florida USA (1985)
- [K86] I. Kraljic, Detection of singlet oxygen and its role in dye-sensitized photooxidation in aqueous and micellar solutions, *Biochimie* 68 (2005) 807
- [K91] J. R. Kanovsky, Quenching of singlet oxygen by human red cell ghosts, *Photochem. Photobiol.* 53 (1991) 93
- [K05] G. Karp, *Molekulare Zellbiologie*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Kap. 1 und 4, 1. Auflage (2005)
- [KMS01] R. Kilger, M. Maier, R.-M. Szeimies, W. Bäuml, Bidirectional energy transfer between the triplet T₁ state of photofrin and singlet oxygen in deuterium oxide, *Chem. Phys. Lett.* 343 (2001) 543
- [L86] G. Laustriat, Molecular mechanisms of photosensitization, *Biochimie* 68 (1986) 771
- [LB62] H. Landolt, R. Börnstein, *Landolt-Börnstein Zahlenwerte und Funktionen aus Physik, Chemie, Astronomie, Geophysik und Technik. II Band. Eigenschaften der Materie in ihren Aggregatzuständen. 2. Teil. Gleichgewichte ausser Schmelzgleichgewichten. Bandteil b. Lösungsgleichgewichte I*, Springer Verlag Berlin, 6. Auflage (1962)
- [LBG88] A. P. Losev, L. M. Byteva, G. P. Gurinovich, Singlet oxygen luminescence quantum yields in organic solvents and water, *Chem. Phys. Lett.* 143 (1988) 127
- [MB81] J. Moan, E. Boye, Photodynamic effect on DNA and cell survival of human cells sensitized by hematoporphyrin, *Photobiochem. Photobiophys.* 2 (1981) 301
- [MBB05] M. Möller, H. Botti, C. Batthyany, H. Rubbo, R. Rafael, A. Denicola, Direct measurement of nitric oxide and oxygen partitioning into liposomes and low density lipoprotein, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 8850
- [MBS05] T. Maisch, C. Bosl, R. M. Szeimies, N. Lehn, and C. Abels, Photodynamic effects of novel XF porphyrin derivatives on prokaryotic and eukaryotic cells, *Antimicrob Agents Chemother* 49 (2005) 1542
- [MF83] S. L. Mattes, S. Farid, Photochemical electron-transfer reactions of olefin and related compounds, in: A. Padwa, M. Dekker, *Organic Photochemistry*, New York, 6 (1983) 233

- [MFB05] T. Maisch, B. Franz, J. Baier, M. Maier, M. Landthaler, R. M. Szeimies, W. Bäuml, Investigation of photodynamic inactivation of bacteria using the detection of singlet oxygen luminescence, übermittelt zu EMBO (European Molecular Biology Organization) Journal (2005)
- [MJC96] C. Marti, O. Jürgens, O. Cuenca, M. Casals, S. Nonell, Aromatic ketones as standards for singlet molecular oxygen $O_2(^1O_g)$ photosensitization. Time-resolved photoacoustic and NIR emission studies, J. Photochem. Photobiol. A: Chem. 97 (1996) 11
- [MK72] P. B. Merkel, D. R. Kearns, Radiationless decay of singlet molecular oxygen in solution. An experimental and theoretical study of electronic-to-vibrational energy transfer, J. Am. Chem. Soc. 94 (1972) 7244
- [MLM03] G. R. Martinez, A. P. Loureiro, S. A. Marques, S. Miyamoto, L. F. Yamaguchi, J. Onuki, E. A. Almeida, C. C. Garcia, L. F. Barbosa, M. H. Medeiros, P. Di Mascio, Oxidative and alkylating damage in DNA, Mutat. Res. 544 (2003) 115
- [MMM04] S. Miyamoto, G. R. Martinez, A. P. B. Martins, M. H. G. Medeiros, P. Mascio, ^{18}O -Labeled lipid hydroperoxides and HPLC coupled to mass spectrometry as valuable tools for studying the generation of singlet-oxygen in biological system, BioFactors 22 (2004) 333
- [MSJ04] T. Maisch, R. M. Szeimies, G. Jori, c. Abels, Antibacterial photodynamic therapy in dermatology, Photochem. Photobiol. Sci 3 (2004) 907
- [MSM99] H. Minami, K. Sato, T. Maeda, H. Taguchi, K. Yoshikawa, H. Kosaka, T. Shiga, T. Tsuji, Hypoxia potentiates ultraviolet A-induced riboflavin cytotoxicity, J Invest Dermatol 113 (1999) 77
- [MWS97] A. Morita, T. Werfel, H. Stege, C. Ahrens, K. Karmann, M. Grewe, S. Grether-Beck, T. Ruzicka, A. Kapp, L. O. Klotz, H. Sies, J. Krutmann, Evidence that Singlet Oxygen-induced Human T Helper Cell Apoptosis Is the Basic Mechanism of Ultraviolet-A Radiation Phototherapy, J. Exp. Med. 186 (1997) 1763
- [OCO02] B. J. Ortwerth, V. Chemoganskiy, P. R. Olesen, Studies on Singlet Oxygen Formation and UVA Light-mediated Photobleaching of the Yellow Chromophores in Human Lenses, Exp Eye Res 74 (2002) 217
- [OZM99] S. Oelckers, T. Ziegler, I. Michler, B. J. Röder, Time-resolved detection of singlet oxygen luminescence in red cell ghost suspensions: concerning a signal

- component that have been attributed to $^{1}O_2$ luminescence from the inside of a native membrane, *Photochem. Photobiol. B.* 53 (1999) 121
- [P94] W. Pschyrembel, *Klinisches Wörterbuch*, Nikol Verlagsgesellschaft mbH Hamburg, 257. Auflage (1994)
- [P01] Q. Peng, Correlation of intracellular and intratumoral photosensitizer distribution with photodynamic effect, in: P. Calzavara-Pinton, R.-M. Szeimies, B. Ortel, *Photodynamic Therapy and Fluorescence Diagnosis in Dermatology*, Kap. 4, Elsevier Amsterdam (2001)
- [P01b] PreSens GmbH, Regensburg, *Handbuch für Microx TX VP 1.0* (2001)
- [PDC03] R. Le Panse, L. Dubertret, B. Coulomb, p38 mitogen-activated protein kinase activation by ultraviolet A radiation in human dermal fibroblasts, *Photochem. Photobiol.* 78 (2003) 168
- [PS84] J. G. Parker, W. D. Stanbro, Dependence of photosensitized singlet oxygen production on porphyrin structure and solvent, in: *Porphyrin Localization and Treatment of Tumors*, Alan R. Liss, Inc. (1984) 259
- [PT86] R. Pottier, T. G. Truscott, The photochemistry of haematoporphyrin and related systems, *Int. J. Radiat. Biol.* 50 (1986) 421
- [QQG89] R. Quint, R. M. Quint, N. Getoff, T. Gantchev, M. Shopova, Flash Photolysis and ESR Studies on Hematoporphyrin and Photofrin II in Polar and Microheterogeneous Environment, *Z. Naturforsch.* 44a (1989) 283
- [S94] L. Stryer, *Biochemie*, Spektrum Akademischer Verlag, 2. Auflage (1994)
- [S98] Sanofi Pharmaceuticals, Inc., Photofrin (porfimer sodium), *Medikamentenpackungsbeilage* (1998)
- [S03] Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Productinformation 1,2-Diacyl-sn-glycero-3-phosphocholin, (2003)
<http://www.sigmaaldrich.com/sigma/product%20information%20sheet/p3556pis.pdf>
- [S05] Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Productinformation: R9504 (-)-Riboflavin, F1392 Riboflavin 5-monophosphate Sodium salt Dihydrate, F6625 Flavin adenine dinucleotide Disodium salt Hydrate, N1636 β -Nicotinamide adenine dinucleotide Hydrate, N5755 β -Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate

- Hydrate, C3045 Cholesterol, U7500 4-Imidazoleacrylic acid, (2005)
<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/search/ProductDetail/SIGMA/R9504>
<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/search/ProductDetail/SIGMA/F1392>
<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/search/ProductDetail/SIGMA/F6625>
<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/search/ProductDetail/SIGMA/N1636>
<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/search/ProductDetail/SIGMA/N5755>
<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/search/ProductDetail/SIGMA/C3045>
<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/search/ProductDetail/SIGMA/U7500>
- [S05b] R. Schmidt, The balance between charge transfer and non-charge transfer pathways in the sensitization of singlet oxygen by $\pi\pi^*$ triplet state, *Photochem. Photobiol. Sci.*, 4 (2005) 481
- [S05c] J. Schwanzl, Computer-Simulationen (Monte-Carlo) zur Diffusion und zum Zerfall von Singulett-Sauerstoff in komplexen Systemen, Diplomarbeit, Fachhochschule Regensburg (2005)
- [SFB02] M. Soncin, C. Fabris, A. Buseti, D. Dei, D. Nistri, G. Roncucci, G. Jori, Approaches to selectivity in the Zn(II)-phthalocyanine-photosensitized inactivation of wild-type and antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus*, *Photochem Photobiol Sci*, 1 (2005) 815
- [SG68] B. I. Stepanov, V. P. Gribkovskii, *Theory of luminescence*, Iliffe Books (1968)
- [SKA96] R.-M. Szeimies, S. Karrer, C. Abels, P. Steinbach, S. Fickweiler, H. Messmann, W. Bäuml, M. Landthaler, 9-acetoxy-2,7,12,17-tetrakis-(β -methoxyethyl)-porphycene (ATMPn), a novel photosensitizer for photodynamic therapy: uptake kinetics and intracellular localization, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 34 (1996) 67
- [SL94] R. M. Szeimies, M. Landthaler, *Mit Licht gegen Krebs, Blick in die Wissenschaft* 5 (1994) 22
- [SMB03] J. B. Seal, B. Moreira, C. D. Bethel, R. S. Daum, Antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus* at the University of Chicago Hospitals: a 15-year longitudinal assessment in a large university-based hospital, *Infect Control Hosp Epidemiol* 24 (2003) 403
- [SS01] R. Schmidt, F. Shafi, Influence of Charge Transfer Interactions on the Sensitization of Singlet Oxygen: Formation of $O_2(^1\Sigma_g^+)$, $O_2(^1\Delta_g)$, and $O_2(^3\Sigma_g^-)$ during

- Oxygen Quenching of Triplet Excited Biphenyl Derivatives, *J. Phys. Chem. A* 105 (2001) 8871
- [SS03] C. Schweitzer, R. Schmidt, Physical Mechanisms of Generation and Deactivation of Singlet Oxygen, *Chem. Rev.* 103 (2003) 1685
- [STD94] R. Schmidt, C. Tanielian, R. Dunsbach, C. Wolff, Phenalenone, a Universal Reference Compound for the Determination of Quantum Yields of Singlet Oxygen (Delta) Sensitization, *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* 79 (1994) 11
- [STT99] M. M. Siegel, K. Tabei, R. Tsao, M. J. Pastel, R. K. Pandey, S. Berkenkamp, F. Hillenkamp, M. S. de Vries, Comparative Mass Spectrometric Analyses of Photofrin Oligomers by Fast Atom Bombardement Mass Spectrometry, UV and IR Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry, Electrospray Ionization Mass Spectrometry and Laser Desorption/Jet-cooling Photoionization Mass Spectrometry, *J. Mass Spectrom.* 34 (1999) 661
- [SW96] R. S. Sohal, R. Weindruch, Oxidative stress, caloric restriction, and aging. *Science.* 273 (1996) 59
- [TCL03] K. Takeshima, A. Chikushi, K. K. Lee, S. Yonehara, K. Matsuzaki, Translocation of analogues of the antimicrobial peptides magainin and buforin across human cell membranes, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 1310
- [TJ07] H. von Tappheimer, A. Jodlbauer, Die Sensibilisierende Wirkung Fluoreszierender Substanzen. Gesammelte Untersuchungen ueber die Photodynamische Erscheinung, FCW Vogel Leipzig (1907)
- [VEF03] G. Viteri, A. M. Edwards, J. De la Fuente, E. Silva, Study of the interaction between triplet riboflavin and the alpha-, betaH- and betaL-crystallins of the eye lens, *Photochem. Photobiol.* 77 (2003) 535
- [W04] C. Wiesmann, Experimentelle und theoretische Untersuchungen von Singulett-Sauerstoff in Lösungen und Suspensionen, Diplomarbeit, Universität Regensburg (2004)
- [WA97] F. Wilkinson, A. A. Abdel-Shafi, Mechanism of Quenching of Triplet States by Oxygen: Biphenyl Derivatives in Acetonitrile, *J. Phys. Chem. A* 101 (1997) 5509
- [WHR95] F. Wilkinson, W. P. Helman, A. B. Ross, Rate constants for the decay and reactions of the lowest electronically excited states of molecular oxygen in

- solution. An expanded and revised compilation, J. Phys. Chem. Ref. Data 24 (1995) 663
- [WHS05] , K. Wertz, P. B. Hunziker, N. Seifert, G. Riss, M. Neeb, G. Steiner, W. Hunziker, R. Goralczyk, beta-Carotene interferes with ultraviolet light A-induced gene expression by multiple pathways, J. Invest. Dermatol. 124 (2005) 428
- [WO97] B. C. Wilson, M. Olivo, Subcellular localization of Photofrin and aminolevulinic acid and photodynamic cross-resistance in vitro in radiation-induced fibrosarcoma cells sensitive or resistant to Photofrin-mediated photodynamic therapy, Photochem. Photobiol. 65 (1997) 166
- [ZPC01] C. Zane, G. De Panfilis, P. Calzavara-Pinton, Photosensitizers-systemic sensitization, in: P. Calzavara-Pinton, R.-M. Szeimies, B. Ortel, Photodynamic Therapy and Fluorescence Diagnosis in Dermatology, Kap. 7, Elsevier Amsterdam (2001)

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mir während meiner Promotion zur Seite standen. Mein besonderer Dank gilt:

Prof. Dr. Max Maier vom Institut für Experimentelle und Angewandte Physik der Universität Regensburg, für die freundliche Aufnahme an seinem Lehrstuhl, die vielen lehrreichen Diskussionen und das stetige Interesse an meiner Arbeit.

PD Dr. rer. nat. Wolfgang Bäuml von der Klinik und Poliklinik für Dermatologie des Klinikums der Universität Regensburg, der mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite stand.

Prof. Dr. med. M. Landthaler und PD Dr. med. R. M. Szeimies, für die freundliche Aufnahme in der PDT-Arbeitsgruppe der Klinik und Poliklinik für Dermatologie.

Dr. rer. nat. Tim Maisch, der mir stets in biologischen Fragen und Diskussionen weitergeholfen und unterstützt hat.

Dr. rer. nat. Roland Engl, der mich in das hier behandelte Gebiet der Singulett-Sauerstoff-Detektion eingeführt hat.

Doreen Sontag, Claudia Bosl, Barbara Franz und Eva Engel, für die sehr gute Probenpräparation.

Katrin Pindl, Christopher Wiesmann, Thomas Fuß, Johannes Schwanzl und Claudia Pöllmann, für die sehr gute Zusammenarbeit in unserer Arbeitsgruppe.

Florian Flossmann als langjährigem angenehmen Zimmermitbewohner und Diskussionspartner, insbesondere in unphysikalischen Fragen.

Herrn Thomas Ascherl, für die schnelle und kompetente Hilfe bei technischen Problemen und Verbesserungen.

Allen weiteren Mitgliedern der PDT-Arbeitsgruppe von PD Dr. Szeimies und des Lehrstuhls von Prof. Dr. Maier für die jederzeit freundliche Unterstützung und ein Arbeitsklima zum Wohlfühlen.

Sowie Alexandra, die Frau an meiner Seite, für das Wohlbefinden außerhalb der Physik.

Kontakt: <http://www.jbaier.de>